

**LUCAS LEITE CUNHA**

**ANÁLISE CRÍTICA DO PAPEL DA INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS IMUNES NO  
PROGNÓSTICO DO PACIENTE COM CARCINOMA DIFERENCIADO DE  
TIREOIDE**

**CAMPINAS, 2012**



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**ANÁLISE CRÍTICA DO PAPEL DA INFILTRAÇÃO DE  
CÉLULAS IMUNES NO PROGNÓSTICO DO PACIENTE COM  
CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE**

**Lucas Leite Cunha**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básica, sob a orientação da Profa. Dra. Laura Sterian Ward.

**CAMPINAS, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

C914a	<p>Cunha, Lucas Leite, 1987 - Análise crítica do papel da infiltração de células imunes no prognóstico do paciente com carcinoma diferenciado de tireoide / Lucas Leite Cunha. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.</p> <p style="text-align: center;">Orientador : Laura Sterian Ward. Coorientador : José Vassallo. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p style="text-align: center;">1. Tireóide-câncer. 2. Evasão tumoral. 3. Linfócitos T. I. Ward, Laura Sterian. II. Vassallo, José. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Critical analysis of the role of immune cells infiltration in prognosis of patients with differentiated thyroid carcinoma.

**Palavras-chave em inglês:**

Thyroid neoplasm

Tumor scape

T-lymphocytes

**Titulação:** Mestre em Clínica Médica

**Área de concentração:** Ciências Básicas

**Banca examinadora:**

Laura Sterian Ward [Orientador]

Fabiana Granja

Carmen Silvia Passos Lima

**Data da defesa:** 15-02-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica



**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**  
Lucas Leite Cunha

Orientador: Profa. Dra. Laura Sterian Ward

**Membros:**

1. Profa. Dra. Fabiana Granja

2. Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima

3. Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/02/2012

Gostaria de dedicar este trabalho à minha família, que sempre esteve ao meu lado:

- Aos meus pais que sempre me apoiaram em minha carreira. Sem eles, acredito que eu não teria conseguido;

- Aos meus destemidos avós, Maria Natividade Leite, Henrique Souza Leite (in memorian), Mario da Cunha (in memorian) e Nilsa da Cunha (in memorian). Tais como muitos brasileiros de nossa gente, sofreram penosa miséria no decurso de suas vidas. Esforço. Aridez. Muitos destes desafiaram a vida seca nordestina e migraram em busca de um futuro. Infelizmente, alguns não puderam nem estudar nem ver o fruto de seus empenhos. Por isso, a todos estes, esta honesta dedicatória.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, primeiramente, por ter me sustentado até agora: sem Ele, nada haveria acontecido!

Aos meus admiráveis pais, Hέλvio Honόrio da Cunha e Jύlia Maria Leite Cunha, que sempre me apoiaram em minha carreira.  minha terna irmã, Juliana Leite Cunha Taleb, pelo apoio e incentivo.  pequena Valentinha, por me fazer rir nos momentos mais inesperados.  minha querida tia, Jacirema Brunet Leite Rodrigues, por me ajudar em momentos difíceis.  minha avó, Maria Natividade Brunet Leite, por sempre interceder a Deus a meu favor. s minhas inesquecíveis primas, Jacqueline e Isabelli (e respectivas famίlias), que deixam minha famίlia mais alegre.  querida tia Vilma Brunet por me ensinar a escrever.

A minha orientadora, Professora Laura, por contribuir para ampliação da minha visão. Seu exemplo de vida, sua postura frente aos problemas, sua firmeza e seu empenho me inspiram no combate a uma sociedade melhor. Definitivamente, uma ela tem uma trajetória heróica.

A minha amiga Professora Elaine Morari, por me ouvir e por me ensinar muito, principalmente na disciplina da superação!

Ao ilustre Professor José Vassallo, que muito me ensinou e instruiu, sempre com muito bom humor de quem tem uma história heróica.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética Molecular do Câncer e laboratórios vizinhos: Natassia, Carolina, Raquel, Aline Carolina, Angélica, Jacqueline, Renata, Fernando, Ulieme, Viviane e Luiza. Agradeço pelos momentos juntos, pela paciência, ensinamentos, diversão, carinho e amizade. Muito obrigado! Um agradecimento especial  Marjory, Rita e Mariana.

Aos amigos Fabio Conte, Joseane Morari, Daniela Razolli e Suely Nonogaki, que me ajudaram com tecnologias como Real Time PCR, imunfluorescência de dupla coloração e imunohistoquímica.



*“Irmãos, quanto a mim, não julgo que o haja alcançado [a perfeição]; mas uma coisa faço, e é que, esquecendo-me das coisas que atrás ficam, e avançando para as que estão diante de mim, prossigo para o alvo, pelo prêmio da soberana vocação de Deus em Cristo Jesus.”*

Trecho da carta do apóstolo São Paulo aos Filipenses capítulo 3, versos 13 e 14.

## **RESUMO**

O câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais comum. O objetivo geral deste projeto é investigar o padrão de expressão gênica e protéica de tumores resistentes e suscetíveis à ativação do sistema imunológico, bem como pesquisar evidências de mecanismos de evasão tumoral da resposta imune. Foram investigados 398 pacientes cujas amostras de tecidos foram mantidas no banco de tecidos do Hospital A.C.Camargo, São Paulo, sendo 253 carcinomas papilíferos, 13 carcinomas foliculares e 132 tumores benignos. O perfil de expressão protéica dos tumores foi avaliado por imunoistoquímica e a infiltração de células do sistema imunológico foi caracterizada por meio de marcadores imunoistoquímicos. Tiroidite linfocítica crônica concomitante ao câncer foi mais freqüente entre as mulheres, em tumores menos agressivos que não apresentavam invasão extratireoideana ou metástases ao diagnóstico, e em tumores pequenos, menores que 2 cm. O teste de log-rank mostrou que a presença de Tiroidite linfocítica crônica concomitante ao câncer está associada ao maior tempo livre de doença. A infiltração de macrófagos foi mais freqüente entre as mulheres e foi associado à maior tempo de sobrevida livre de recidiva. A infiltração de linfócitos CD3+ se correlacionou à malignidade e está associada à presença de metástases ao diagnóstico. As infiltrações de linfócitos CD4+ e CD20+ foram relacionadas às características de melhor prognóstico e a infiltração de linfócitos CD8+ pode ser um marcador de melhor prognóstico. A expressão da proteína CD56 foi mais freqüente entre os tecidos benignos e não está associada ao prognóstico dos pacientes com carcinoma diferenciado de tireóide. Por sua vez, a infiltração de linfócitos FoxP3+ se correlacionou a características de menor agressividade tumoral. A expressão de RNAm B7-H1 foi característica

de tecidos malignos e a proteína B7-H1 apontou um comportamento mais agressivo dos carcinomas. Tanto a infiltração de linfócitos Th17 e quanto células supressoras derivadas da linhagem mielóide foram mais freqüentes entre os tumores malignos, ainda que somente a infiltração de Th17 se correlacionasse a características de melhor prognóstico. Nossos dados sugerem que o carcinoma diferenciado de tireóide seja ricamente infiltrado por um conjunto de diferentes células do sistema imunológico. Provavelmente esta infiltração é dependente do padrão de expressão gênica e protéica destes cânceres, padrão este que pode refletir a imunogenicidade destes tumores. Mais ainda, a associação entre a infiltração destas células e características de melhor prognóstico, sugere que exista uma resposta imunológica ativa paramentada contra o carcinoma diferenciado de tireóide capaz de exercer papel antitumoral.

## ***SUMMARY***

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy. The objective of this project is to investigate the pattern of gene and protein expression of tumors resistant and susceptible to activation of the immune system as well as research evidence tumor evasion mechanisms of the immune response. We investigated 398 patients whose tissue samples were kept in the tissue bank ACCamargo Hospital, São Paulo, with 253 papillary carcinomas, 13 follicular carcinomas and 132 benign tumors. The protein expression profile of tumors was assessed by immunohistochemistry and the infiltration of immune cells was characterized by immunohistochemical markers. Chronic lymphocytic thyroiditis concurrent to cancer was more frequent among women, less aggressive tumors that did not have extra thyroid invasion or metastases at diagnosis, and small tumors smaller than 2 cm. The log-rank test showed that the presence of chronic lymphocytic thyroiditis concurrent to cancer was associated with longer relapse-free. Macrophage infiltration was more frequent among women and was associated with relapse-free survival. The infiltration of CD3+ lymphocytes correlates with malignancy and is associated with the presence of metastases at diagnosis. The infiltration of CD4+ and CD20+ were related to the better prognosis. The infiltration of CD8+ lymphocytes may be a marker of better prognosis. The CD56 protein expression was more frequent among benign tissues and is not associated with prognosis of patients with differentiated thyroid carcinoma. The infiltration of FoxP3+ lymphocytes correlated with less aggressive tumor characteristics. The mRNA expression of B7-H1 was characteristic of malignant tissues and B7-H1 protein could point to a more aggressive behavior of the differentiated thyroid carcinoma. Both the infiltration of Th17

lymphocytes and the myeloid derived suppressor cells were more frequent in malignant tumors, although only the infiltration of Th17 correlated with features of better prognosis. Our data suggest that differentiated thyroid carcinoma is enriched by a number of different immune cells. Probably this infiltration is dependent on the pattern of gene and protein expression of these cancers, a pattern that may reflect the immunogenicity of these tumors. Moreover, the association between these cells and infiltration characteristics of better prognosis, suggests that there is an active immune response against attired differentiated thyroid carcinoma can exert antitumor role.

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
APCs	do inglês, Antigen Presenting Cells (Células apresentadoras de antígeno)
ATM	do inglês, ataxia telangiectasia mutated (Gene mutado em ataxia telangiectasia)
CCL-2	do inglês, chemokine (C-C motif) ligand 2 (Quimiocina ligante do motivo C-C 2)
CD20	do inglês, cluster of differentiation 20
CD4	do inglês, cluster of differentiation 4
CD56	do inglês, cluster of differentiation 56
CD68	do inglês, cluster of differentiation 68
CD8	do inglês, cluster of differentiation 8
cDNA	DNA complementar
CDT	Carcinoma Diferenciado da Tireoide
CF	Carcinoma Folicular
CPT	Carcinoma Papilífero da Tireoide
CPTVF	Carcinoma Papilífero da Tireoide Variante Folicular
Ct	do inglês, Threshold Cycle
CTLA-4	do inglês, Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DAB	3,3 - tetrahidrocloreto-diaminobenzidina
DAPI	do inglês, 4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	do inglês Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucléico)
EUA	Estados Unidos da América
FITC	do inglês, fluorescein isothiocyanate

FKH	do inglês, winged-helix/forkhead
FoxP3	do inglês, forkhead box P3
GAPDH	do inglês, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IQ	Imunoistoquímica
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-1beta	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Sintase de óxido nítrico induzível
ITIM	do inglês, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
JAK3	do inglês, Janus kinase 3
LIT	Linfócitos infiltrantes de tumor
MDSC	do inglês, myeloid-derived supressor cells (Célula supressora derivada da linhagem mielóide)
MHC	do inglês, Major Histocompatibility Complex
MIT	Macrófagos infiltrantes de tumor
Mo	Moda
MUC1	Proteína Mucina 1
NIS	do inglês, Sodium/Iodide transporter
NK	do inglês, células Natural Killers
NO	Óxido nítrico
PBS	do inglês, Phosphate buffered saline
PCI	Pesquisa de Corpo Inteiro
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês polymerase chain reaction

PD-L1	do inglês programmed death receptor-ligand 1
PDTC	Carcinomas pouco diferenciados da tireoide
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	do inglês, phosphoinositide-3-kinase
PTEN	do inglês, Phosphatase and tensin homolog
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
STAT5	do inglês, signal transducer and activator of transcription 5
Tg	Tireoglobulina
TGF-beta	do inglês, Transforming growth factor-beta
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th17	Linfócito T auxiliar 17
Th2	Linfócito T auxiliar 2
TLC	Tireoidite linfocítica crônica
TMA	do inglês, Tissue Microarray
TNM	do inglês, Tumor Node Metastasis
TSH	do inglês, Thyroid-stimulating Hormone (hormônio estimulador da tireóide)
VEGF	do inglês, vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular)



## ***LISTA DE TABELAS***

<b>Tabela 1.</b> Análise descritiva resumindo todos os pacientes estudados. Os dados são expressos em número absoluto.....	17
<b>Tabela 2.</b> Especificações dos marcadores imunoistoquímicos.....	21
<b>Tabela 3.</b> Resumo do perfil clínicos dos pacientes e características anatomopatológicas dos tumores estudados.....	34
<b>Tabela 4.</b> Relações significativas encontradas entre os diferentes diagnósticos histopatológicos, de acordo com a análise de marcadores de células imunológicas.....	37
<b>Tabela 5:</b> Relações encontradas entre os diferentes marcadores em amostras de CDT, Os dados estão expressos em valor de p.....	41

## ***LISTA DE FIGURAS***

<b>Figura 1:</b> Forças imunoestimulatórias e imunossupressivas no microambiente tumoral.....	3
<b>Figura 2:</b> Mecanismos de cronificação de inflamações proporcionado por IL-17.....	7
<b>Figura 3:</b> Recrutamento e mecanismos de ação de MDSCs.....	9
<b>Figura 4:</b> Estimativa de incidência dos principais tumores mais frequentes em ambos os sexos para o ano de 2012, excetuando-se os cânceres de pele não-melanoma.....	10
<b>Figura 5:</b> Painel de células do sistema imunológico em carcinomas papilíferos da tireoide.....	23
<b>Figura 6:</b> Linfócitos CD4+/IL-17+ (Th17) infiltrando tecido de carcinoma papilífero da tireoide.....	30
<b>Figura 7:</b> Células CD11b+/CD33+ (MDSCs) infiltrando tecido de carcinoma papilífero da tireoide.....	31
<b>Figura 8:</b> Curva de Kaplan-Meyer mostrando aumento do tempo livre de doença em pacientes com TLC concomitante ao CDT.....	35

<b>Figura 9:</b> Curva de Kaplan-Meyer mostrando aumento do tempo livre de doença em pacientes com MIT.....	39
<b>Figura 10:</b> Curva de Kaplan-Meyer mostrando a tendência ao aumento do tempo livre de doença em pacientes com infiltração de linfócitos CD4+.....	44
<b>Figura 11:</b> Curva de Kaplan-Meyer mostrando o aumento do tempo livre de doença em pacientes com infiltração de linfócitos CD8+.....	46
<b>Figura 12:</b> Curva de Kaplan-Meyer mostrando a tendência ao aumento do tempo livre de doença em pacientes com infiltração de linfócitos CD20+.....	47
<b>Figura 13:</b> Expressão progressiva de FoxP3 é mostrada se compararmos diferentes tecidos e lesões tireoideanos.....	53

## SUMÁRIO

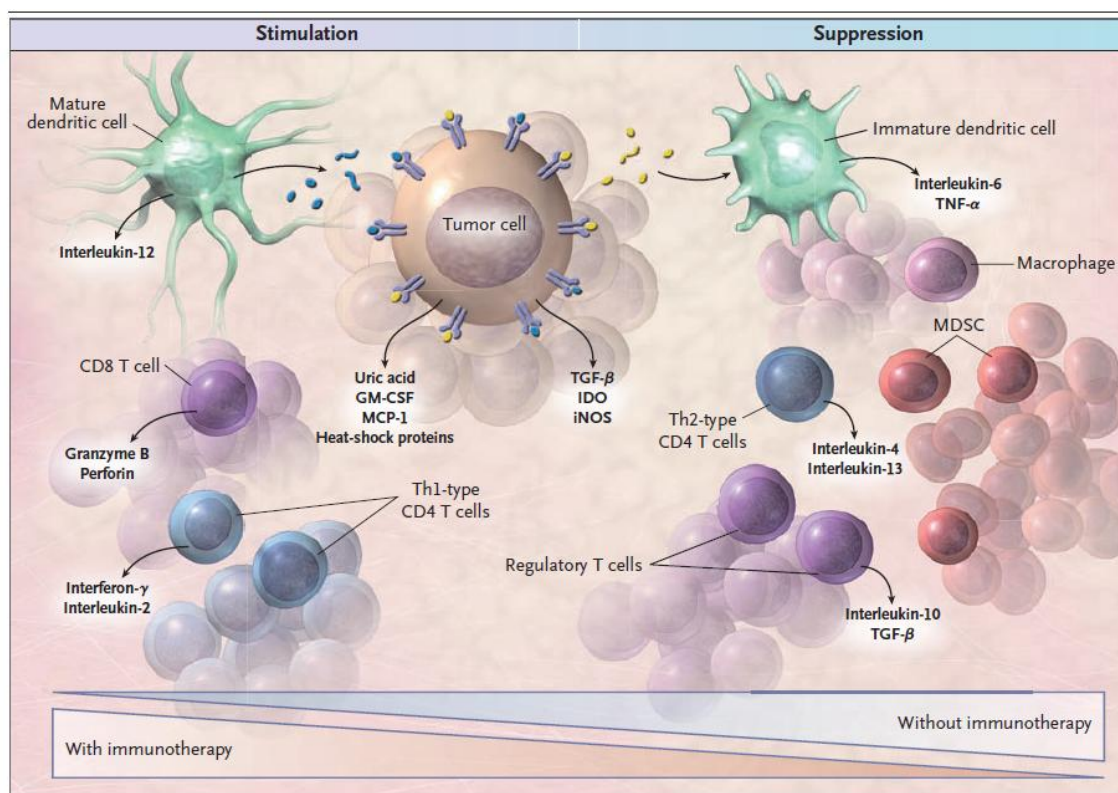
INTRODUÇÃO	1
Imunologia Tumoral	2
Imunologia do câncer de tireoide	10
OBJETIVOS	13
MATERIAL E MÉTODOS	15
Pacientes	16
Imunoistoquímica	19
Avaliação da IQ	22
Extração de RNA	24
Reação de transcrição reversa	25
PCR quantitativo (q-PCR) – Real Time PCR	26
Imunofluorescência de dupla coloração	28
Análise Estatística	32
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	87



## **1. Imunologia tumoral**

O conceito de imuno-sobrevivência tumoral parte do pressuposto de que a função fisiológica do sistema imune é o reconhecimento e eliminação de clones de células transformadas (1) que tendem a possuir características antigênicas. A imunidade anti-tumoral, como a imunidade contra patógenos, envolve vários tipos celulares: células T, B, “Natural Killers” (NK), macrófagos, células dendríticas, granulócitos e mastócitos (2-3). O resultado final da interação celular entre tumor e sistema imunológico é, então, dependente de quão bem sucedido é o tumor em estabelecer um ambiente que iniba a resposta anti-tumoral e promova seu próprio desenvolvimento (1).

Ao conjunto de estratégias que o tumor apresenta para apresentar sucesso frente a resposta anti-tumoral chama-se “mecanismo de evasão tumoral” do sistema imunológico (Figura 1). Para tanto, o tumor utiliza diversos meios: regula a expressão de moléculas como Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) de classe I; regula a rede de citocinas e quimiocinas; regula a expressão de receptores para fatores que promovem o crescimento tumoral; regula a expressão de antígenos tumorais; regula a expressão de moléculas coestimulatórias e coinibitórias; controla o recrutamento de células regulatórias, como linfócitos T regulatórios e células supressoras derivadas da linhagem mielóide entre outras estratégias (4).



**Figura 1:** Forças imunoestimulatórias e imunossupressoras no microambiente tumoral. Um tumor, sobretudo em fases iniciais, atrai vários componentes da resposta imunológica. Antígenos tumorais e fatores solúveis recrutam células dendríticas para o sítio primário do câncer. Estas células fagocitam os antígenos tumorais, processam-nos e são drenadas para linfonodos, onde estimulam resposta imunológica mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> na diferenciação da linhagem Th1 por meio da produção de interferon gama. Estas células T CD4<sup>+</sup> diferenciadas estimulam a expansão da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (T citotóxicos), que combatem o câncer por meio de mecanismos efetores como produção de granzima e perforinas. Outros antígenos tumorais são processados por outros subtipos de células dendríticas, que produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e fator de necrose tumoral alfa, que estimulam a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na linhagem Th2. Esta característica favorece a formação de um microambiente imunossupressor. Este microambiente favorece a diferenciação de linfócitos T regulatórios e recrutamento de células supressoras derivadas da linhagem mielóide. Em geral, quando um tumor é diagnosticado, o balanço entre estimulação e imunossupressão tende a favorecer a imunossupressão. O papel da imunoterapia seria realçar a porção imunoestimulatória desta interação, levando ao combate antitumoral. Extraído de Finn OJ. Cancer immunology. N Engl J Med. 2008 Jun; 358(25):2704-15.

A ativação das células T requer tanto a apresentação antigênica por meio das moléculas apresentadoras de antígenos (APCs) quanto a devida coestimulação, que é chamada de segundo sinal. Contudo outras moléculas, ditas coinibitórias, são antagonistas das coestimulatórias e podem bloquear a ativação das células T bem como interromper a progressão de ciclo celular de células ativadas (5). A resposta, então, da célula T é determinada pela integração destes sinais, tanto coestimulatórios como coinibitórios (4). Dentre as moléculas coinibitórias, destaca-se B7-H1, também chamado de CD279 ou PD-L1 (PD-L1, do inglês *programmed death receptor-ligand 1*) (6).

### ***B7-H1***

B7-H1 é uma proteína transmembrânica, com dois domínios imunoglobulinas extracelulares (um constante e outro variável) e que é codificada por um gene localizado cromossomo 9 em 9p24 (7). Estudos pré-clínicos mostram que células apresentadoras de antígenos que superexpressam B7-H1 são fortemente tolerogênicas (6). B7-H1 é capaz de inibir a ativação de células T e tal atividade inibitória se faz por meio da interação com seu respectivo receptor no linfócito T, de forma a induzir nesta célula a fosforilação de motivos ITIM (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) (8). B7-H1 é expressa em poucos tecidos normais, mas, provavelmente devido à perda da expressão do gene supressor de tumores *PTEN*, vários tipos tumorais superexpressam B7-H1 (9-10). Assim, a expressão de B7-H1 em tumores mediará a diminuição da capacidade proliferativa de linfócitos bem como menor produção de citocinas por células T ativadas, contribuindo, com isso, para a criação de um microambiente imunossupressor (8, 11). Uma das consequências disso é que a expressão de B7-H1 tem sido associada à imunoresistência de vários tumores (12-14).



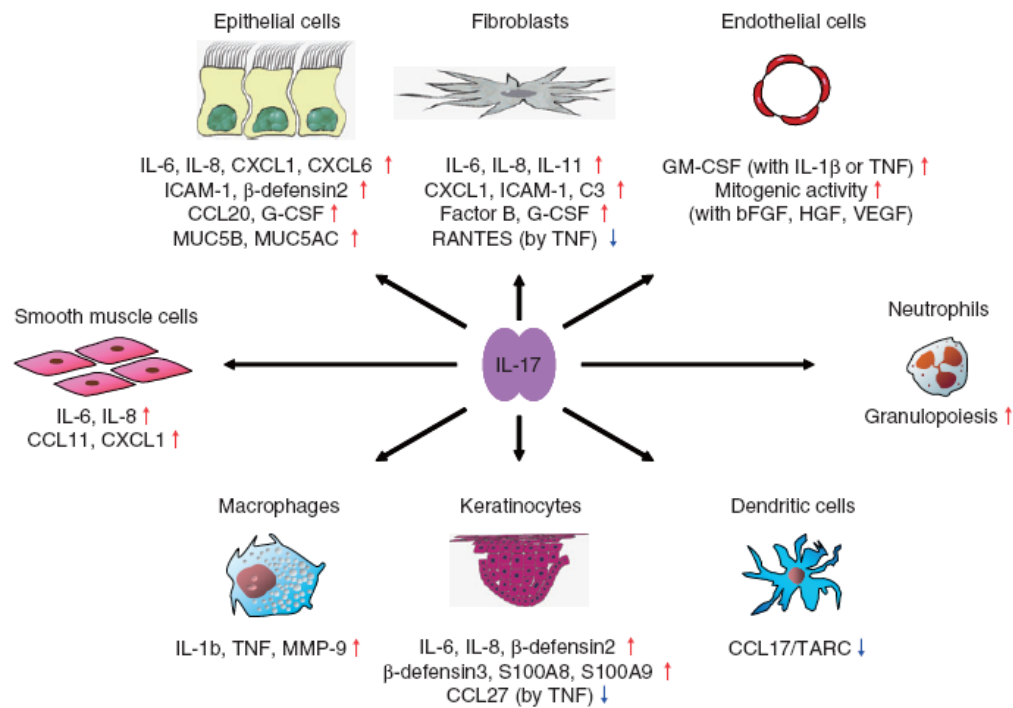
### ***Treg***

Outro mecanismo de evasão tumoral é o controle de células T regulatórias (Treg). Os linfócitos Treg são definidos fenotipicamente por apresentarem  $CD4^+CD25^{\text{alto}}FoxP3^+$  e sua principal função é mediar a supressão das células T (15). Os mecanismos usados por linfócitos Treg para inibição são variados e estão intimamente ligados ao microambiente ao qual esta célula está suscetível, incluindo (16): (a) produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-beta, (17-19); (b) inibição mediada por contato celular mediando, sobretudo, acúmulo de AMPc nas células alvo (20), morte das células alvo por perforina/granzima B ou interação por receptor de morte (21); (c) ou ainda por competição com células T, quer por IL-2, quer por devida coestimulação, uma vez que Treg pode interagir com APCs via CTLA-4/B7 (22). Por possuir função imuossupressora, células Treg são importantes não só na prevenção de autoimunidades, como também no estabelecimento da imunidade antitumoral (23). As Treg estão aumentadas na circulação de pacientes com câncer (24-26) e podem se acumular no tumor (27-28) provavelmente promovendo supressão da resposta antitumoral. Uma evidência disto é o pior prognóstico associado à atividade de células Treg (24, 29). Entretanto, melhor prognóstico também foi relatado em alguns cânceres (30-31). Ainda não é conhecido o papel das células Treg no desenvolvimento do câncer de tiróide.

### ***Células Th17***

Há cerca de duas décadas foi proposto que as células T auxiliares ( $CD4^+$ ) poderiam se diferenciar em duas subpopulações distintas: células Th1 e Th2 (32). Este paradigma foi mantido até meados de 2005 quando foi descoberta uma terceira subpopulação, chamada de células Th17,

que produzem altas quantidades de IL-17 e estimulam a cronificação do processo inflamatório (33-34), como mostrado na figura 2. Células Th17 foram inicialmente caracterizadas em Encefalomielite autoimune experimental (modelo para esclerose múltipla) (35-37), mas hoje já é conhecido que estas células também são importantes mediadoras em várias doenças autoimunes bem como em inflamações associadas ao câncer (38-40). O papel das células Th17 no câncer ainda não está bem estabelecido. Alguns autores sugerem que estas células favoreceriam o crescimento tumoral enquanto outros sugerem um papel protetor (39-41). Estudos clínicos mostraram que pacientes com câncer de ovário em estádios mais avançados têm um aumento do número de células Th17 no sangue periférico e, especialmente, no local do tumor, sugerindo que Th17 tenha um papel na patogênese do câncer de ovário (41). Por outro lado, outros estudos mostram que Th17 teria um papel de proteção antitumoral por meio de ativação das células T citotóxicas (42-43). Embora várias pesquisas tenham se devotado a entender o papel das células Th17 em diferentes tipos de câncer, pouco se sabe a respeito do papel destas células no câncer de tireóide.

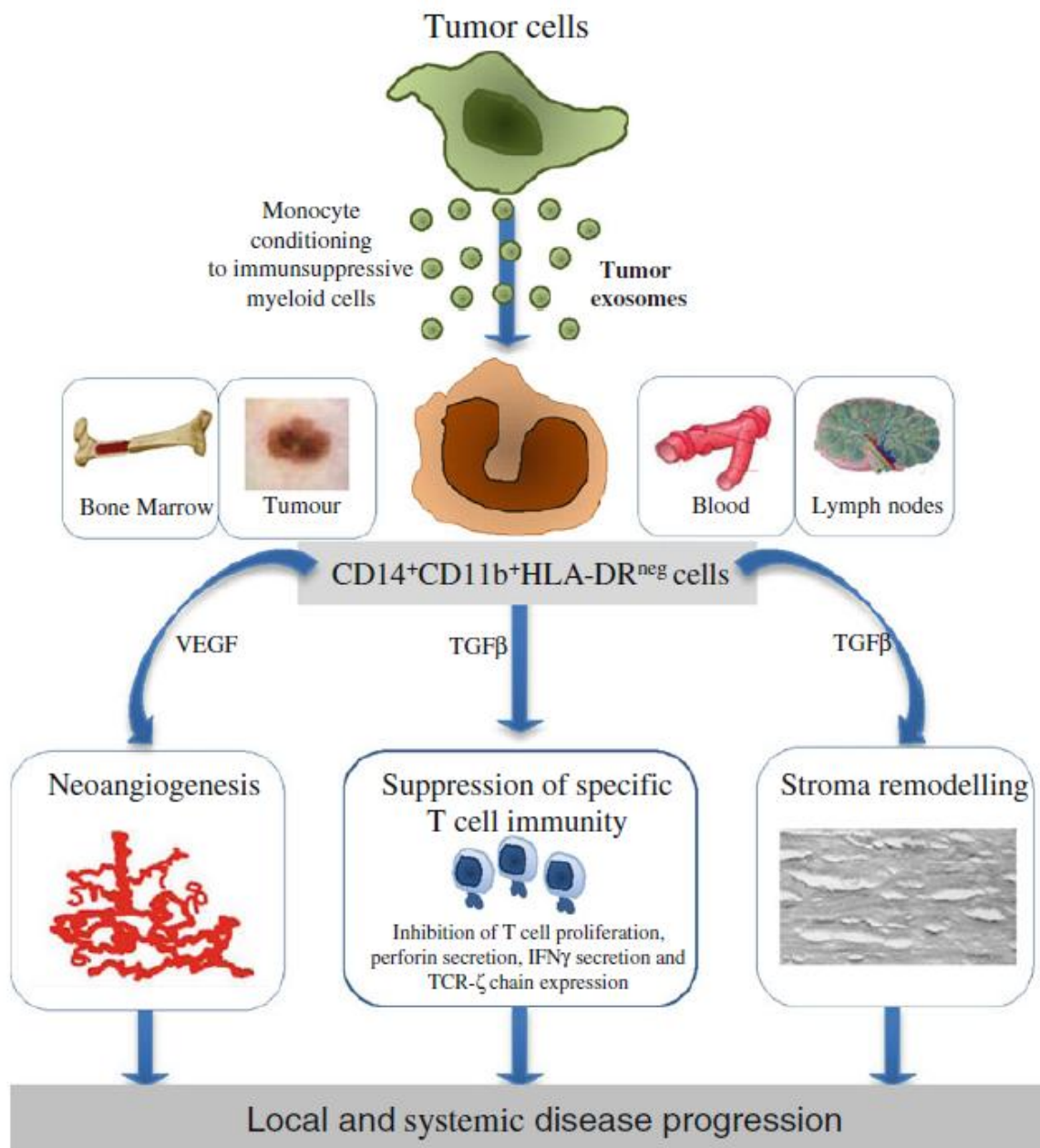


**Figura 2:** Mecanismos de cronificação de inflamações proporcionado por IL-17. Linfócitos Th17 produzem esta citocina, que atua em diferentes tipos celulares levando a cronificação de processos inflamatórios agudos. IL-17 estimula ou inibe a expressão de diversas proteínas em diferentes tipos celulares, como células musculares lisas, células epiteliais, fibroblastos, células endoteliais, neutrófilos, células dendríticas, queratinócitos e macrófagos. Extraído de Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S. Th17 and allergy. *Allergol Int.* 2008 Jun;57(2):121-34.

### ***Células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs)***

As células supressoras derivadas da linhagem mielóide (do inglês, *myeloid-derived suppressor cells*) foram descritas há mais de 20 anos em pacientes com câncer, mas somente agora sua importância funcional no sistema imunológico tem sido compreendida(44-46). Estas células compõem uma população de células mielóides heterogênea incluindo macrófagos, granulócitos e precursores mielo-monocíticos (47). Foram primeiramente caracterizadas em modelos animais e pacientes com câncer e apresentam notável aumento (mais de 10 vezes) no sangue de pacientes com diferentes tipos de cânceres (48-51). MDSCs também já foram encontradas em tecidos

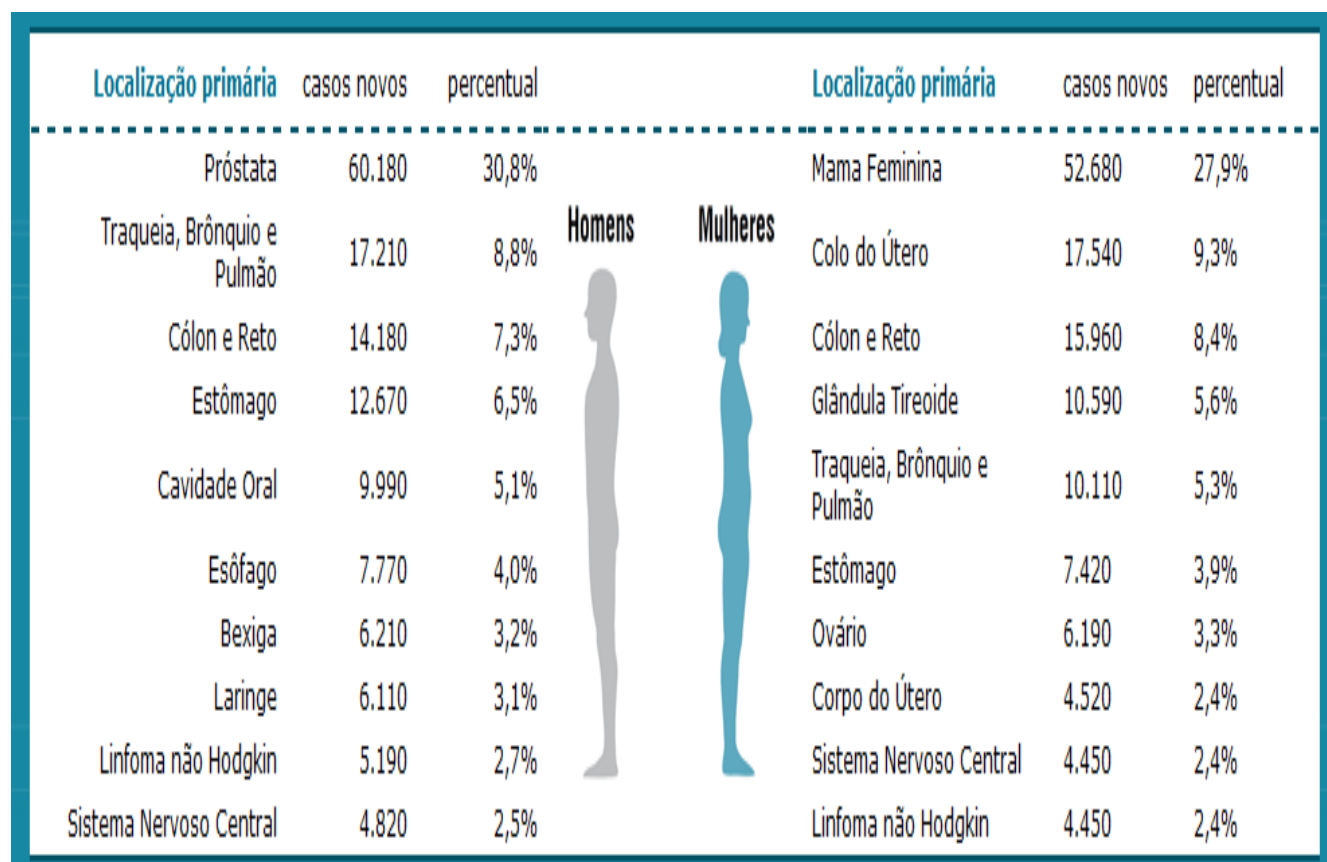
tumorais e linfonodos (52). Como mostrado na figura 3, MDSCs migram ativamente para o local do tumor (53), onde aumentam a expressão de arginase 1 e sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), diminuindo a produção de reativos de oxigênio e/ou rapidamente se diferenciando em macrófagos infiltrantes de tumores (MIT)(54). Ainda, MDSCs secretam um conjunto de fatores pró-inflamatórios e proangiogênicos, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CCL-2 e VEGF (55). As MDSCs são capazes de suprimir a resposta mediada por células T por mecanismos dependentes do metabolismo do aminoácido L-arginina, que leva a um aumento da produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio e consumo de L-arginina em fluidos biológicos (53, 56-57). A limitação de L-arginina inibe a proliferação de células T por diversos mecanismos, como diminuição da expressão da cadeia  $\zeta$  da molécula de CD3 e prevenindo o aumento da expressão da ciclina D3 e cinase dependente de ciclina 4 (58). Já a supressão de células T por meio do NO ocorre por diferentes mecanismos tais como inibição de JAK3 e STAT5, que são fatores de transcrição necessários para ativação do linfócito T (59), inibição da expressão de MHCII (60) e indução da apoptose da célula T (61). Vários estudos mostram que o aumento da produção de reativos de oxigênio é marcante em MDSCs de pacientes com câncer ou modelo animal (53, 62-65). MDSCs também podem inibir a atividade de linfócitos T por induzir células T regulatórias (66).



**Figura 3:** Recrutamento e mecanismos de ação de MDSCs. Células tumorais produzem fatores solúveis que, liberados via exossomos, atuam sobre a medula óssea recrutando células MDSCs. Essas podem se acumular tanto no tumor primário quanto no sangue ou linfonodos. Estas células produzem citocinas e outras substâncias que provocam imunossupressão e aumentam a agressividade dos tumores. Extraído de Filipazzi P, Huber V, Rivoltini L. Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. Cancer Immunol Immunother. 2012 Feb; 61(2):255-63.

## 2. Imunologia do câncer de tireoide

O câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais comum e foi considerado responsável por 1.600 mortes entre 300.000 pacientes diagnosticados com a doença nos EUA em 2009 (67). A incidência do câncer diferenciado de tireoide (CDT), nos Estados Unidos e no mundo continua a aumentar, tendo mais do que dobrado nas últimas três décadas (68-70). Dados recentes do Instituto Nacional do Câncer (INCA) projetam esse tumor como o quarto mais frequente entre mulheres no ano de 2012. (Figura 4). Esperam-se 10.590 casos novos de câncer da tireoide em 2012, com um risco estimado de 11 casos a cada 100 mil mulheres (71).



**Figura 4.** Estimativa de incidência dos principais tumores mais frequentes em ambos os sexos para o ano de 2012, excetuando-se os cânceres de pele não-melanoma. Extraído de Inca, disponível em: [www.inca.gov.br/estimativa/2012/](http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/).

Um aumento paralelo tem sido observado na incidência de doenças auto-imunes da tireoide, como a tireoidite de Hashimoto (72). A tireoidite linfocítica crônica (TLC) e o CDT compartilham algumas características epidemiológicas, tais como a relação com a exposição à radiação ionizante (73-74) e de iodo na dieta (75-76); ambos também compartilham algumas características moleculares (77-84) e são mais prováveis de ocorrer em mulheres que em homens (85-87).

O CDT é um ótimo modelo de estudo para imunologia tumoral, pois frequentemente se mostra associado a sinais de resposta imunológica, como presença de resposta autoimune (exemplo, TLC) concomitante ao tumor (77). Ainda, linfócitos infiltrantes de tumor (LIT) e MIT também são achados comuns em câncer de tireoide (88-92).

Várias observações sugerem que o sistema imunológico pode exercer importante papel prevenindo metástases e recorrência (93). Nosso grupo demonstrou que a probabilidade de pacientes com CDT e com história de autoimunidade tireoidiana prévia ou autoanticorpos antitireoidianos ter um pior prognóstico é significativamente menor do que pacientes sem evidência de autoimunidade prévia, sugerindo que a atividade autoimune contra a glândula tiróide pode exercer um papel de proteção em pacientes com CDT (94).

A associação entre TLC/LIT/MIT e CDT permanece controversa e a presença de TLC nos CDT é reportada em uma ampla frequência, variando de 0,5% a 38% (77, 79, 86, 95-96). Usualmente os CDT expressam antígenos específicos da tiróide como outras células foliculares normais. Assim a resposta imune a esses antígenos em TLC/LIT/MIT pode causar destruição de células tumorais prevenindo, com isso, as recorrências e aumentando a expectativa de sobrevida. Por isso alguns investigadores mostram que a presença de TLC ou ainda LIT e MIT quando associada ao CDT imprime a esses pacientes um melhor prognóstico e menor agressividade da

doença no momento de sua apresentação (92, 97-99). No entanto, outros tireoidologistas não encontraram tal associação, sugerindo que a destruição autoimune das células tumorais existe mas não é capaz de alterar o prognóstico destes pacientes de modo efetivo (84, 100-101).

A falta de resultados unânimes quanto ao papel de TLC/LIT/MIT sobre o prognóstico do CDT deve ser adicionada à falta de informação sobre os possíveis alvos da resposta imune e antigenicidade tumoral. O padrão de transcrição e o perfil de expressão protéica refletem importantes características biológicas e clínicas de malignidades da tireoide (102-103). Nosso grupo demonstrou que proteínas celulares que estão envolvidas no desenvolvimento e progressão de CDT servem como marcadores de malignidade e prognóstico (104-105). Da mesma forma, a expressão de moléculas como MUC1, NIS, ATM, PTEN e CD56 tem sido relatada como um bom marcador de diferenciação e progressão tumoral e pode demonstrar a antigenicidade de CDT (106-111).



## ***OBJETIVOS***

---

O objetivo geral deste projeto é investigar o padrão de expressão gênica e o perfil protéico de tumores resistentes e suscetíveis à ativação do sistema imunológico, respondendo às seguintes perguntas específicas:

1. O perfil de expressão de *B7-H1* e o perfil protéico de B7-H1 está relacionado com a presença de LIT/MIT ou TLC concomitante em CDT?
2. Qual é a composição celular predominante dos LIT em CDT?
3. A presença dos diferentes tipos de células do sistema imunológico infiltrando o tumor (CD68+, CD20+, CD4+, T CD8+, Th17, MDSCs) possui implicações prognósticas aos respectivos pacientes?
4. O perfil de expressão de B7-H1 (RNAm e proteína) poderia diferenciar os casos de melhor prognóstico daqueles com má evolução clínica?
5. Existe correlação entre o perfil molecular de expressão protéica de MUC1, NIS, ATM, PTEN (marcadores já estudados pelo nosso grupo) e CD56 e a presença de LIT/MIT ou TLC concomitante em CDT?

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

## **Pacientes**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C.Camargo (Projeto de Pesquisa número 1259/09-B). Foram investigados 398 pacientes cujas amostras de tecido foram mantidas no Banco de Tecidos do Hospital do Câncer AC Camargo, São Paulo, Brasil, conforme resumido na Tabela 1. Câncer de tireoide foi diagnosticado em 266 pacientes: 253 com carcinoma papilífero (CPT) (153 forma clássica, 80 variante folicular [CPTVF] e 20 variante células altas) e 13 com carcinoma folicular (CF) (7 minimamente invasores e 6 francamente invasores). Além disso, obtivemos 132 tecidos normais ou benignos de tireoide, incluindo: 18 casos de tecido normal, 58 bóci­os nodulares e 56 adenomas foliculares. Informações clínicas foram obtidas dos prontuários.

**Tabela 1:** Análise descritiva resumindo todos os pacientes estudados. Os dados são expressos em número absoluto.

	Diagnóstico histopatológico	Número de pacientes	Gênero		Idade		TLC concomitante	
			M	F	<45	>45	Presente	Ausente
Não maligno	Tecido normal	18	2	16	1	17	-	-
	Bócio nodular	58	8	50	20	38	-	-
	Adenoma folicular	56	7	49	27	29	-	-
	<b>Total</b>	<b>132</b>						
Maligno	<b>Carcinoma papilífero</b>							
	<i>Tipo Clássico</i>	153	28	125	96	57	46	107
	<i>Variante Folicular</i>	80	14	66	36	44	29	51
	<i>Variante células altas</i>	20	4	16	8	12	5	15
	<b>Carcinoma Folicular</b>	13	2	11	3	10	4	9
	<b>Total</b>	<b>266</b>						

**Abreviaturas:** TLC, tireoidite linfocítica crônica; M, sexo masculino; sexo feminino.

**Observação:** Tabela 4 para análise estatística; “-“ significa casos não avaliados.

Tecidos de todos os 398 casos foram fixados em formalina, incluídos em parafina e revistos para confirmação diagnóstica, a fim de selecionar as áreas mais representativas para construir um “tissue microarray” (TMA, Beecher Instruments®, Silver Springs, MD, EUA) para a análise imuno-histoquímica. Além disso, obtivemos 120 tecidos tireoidianos (incluindo 78

carcinomas, 23 de bócio nodular e 19 adenomas foliculares), coletados no momento da cirurgia, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 ° C para estudos moleculares de expressão de RNA mensageiro.

TLC foi investigada no parênquima tireoideano adjacente aos CDT e os pacientes foram classificados de acordo com esta investigação em “TLC concomitante presente” e “TLC concomitante ausente”. Esta análise foi feita com auxílio do professor José Vassallo. A presença de tireoidite foi caracterizada pela intensa infiltração linfocítica com formação de folículos linfóides, fibrose e atividade folicular regenerativa na forma de numerosos folículos pequenos, muitas vezes revestidos por células de Hürthle. LIT e MIT foram avaliados por marcadores imunoistoquímicos. O perfil molecular dos tumores foi avaliado por imunoistoquímica (proteína) e PCR em Tempo Real (q-PCR). Ambos os dados imunológicos e moleculares foram correlacionados com parâmetros clínico-patológicos, tais como idade, sexo, grupo étnico, tamanho tumoral, multifocalidade, invasão extra-tireoideana, presença de metástase linfonodal ao diagnóstico, estadiamento e sobrevida livre de recidiva/metástase.

Os pacientes foram acompanhados com exames periódicos de Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI), TSH e tireoglobulina (Tg) séricos. A PCI consiste no exame de imagem que busca a presença de tecido iodo captante em diferentes regiões do corpo do paciente. Exames adicionais foram feitos de acordo com protocolo padronizado que incluía raios-X, ultra-sonografia, tomografia computadorizada e outros procedimentos para detectar eventuais metástases à distância, por um período de 12 a 298 meses ( $43,50 \pm 33,29$  meses), Moda = 21 meses. Os prontuários foram revistos pelo aluno de mestrado a partir de primeiro de março de 2010, sendo esta revisão finalizada em primeiro de dezembro de 2011. Pacientes com Tg elevada foram submetidos à PCI. Tumores recorrentes e/ou apresentando metástases à distância foram definidos

de acordo com os parâmetros acima referidos. Pacientes com câncer de tireoide foram classificados como livres de doença em 181 casos (87,86%), e com recorrência em 25 casos (12,14%, incluindo 10 mortos pela doença). Quarenta pacientes não puderam ser classificados em qualquer um desses dois grupos, e foram posteriormente excluídos de qualquer análise envolvendo prognóstico. Agressividade ao diagnóstico foi determinada segundo o sistema TNM de classificação e estadiamento de carcinoma diferenciado de tireoide.

### **Imunoistoquímica (IQ)**

Dividimos os marcadores imunoistoquímicos em dois grupos: (a) marcadores de células imunológicas e (b) marcadores de células tumorais. Os marcadores de células imunológicas são aquelas utilizáveis para avaliar subconjunto de LIT e MIT, como CD3, CD4, CD8, CD20, FoxP3 e CD68. Os marcadores de células tumorais são aqueles utilizáveis para avaliar o perfil molecular do tumor, como CD56, NIS, MUC1, PTEN, e ATM. Uma vez que nem todos os casos tiveram amostras de tecido suficiente para todos os ensaios de marcadores, nem todas as avaliações estatísticas feitas neste estudo o foram com o total de casos disponíveis.

Seções de cinco micrômetros foram colocadas em lâminas eletricamente carregadas, desparafinizadas e hidratadas em concentrações decrescentes de álcool. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 minutos. Todos os cortes de tecido foram submetidas ao calor para recuperação antigênica com uso de tampão citrato 10% (10mM, pH 6,0) em um recipiente a vapor (90 ° C durante 30 minutos). Secções de tecidos foram incubadas por 12 a 16 horas a 6 ° C com anticorpos listados na tabela 2. O sistema *Advanced* de detecção foi utilizado (DAKO, Carpinteria, CA, EUA). Foi aplicado DAB (3,3 - tetrahidrocloreto-diaminobenzidina; Sigma, St Louis, MA, EUA) como cromógeno por 5 minutos, em temperatura

ambiente. Os cortes foram contrastado com hematoxilina. Os controles positivos e negativos foram executados no mesmo lote de reação.



**Tabela 2:** Especificações dos marcadores imunohistoquímicos.

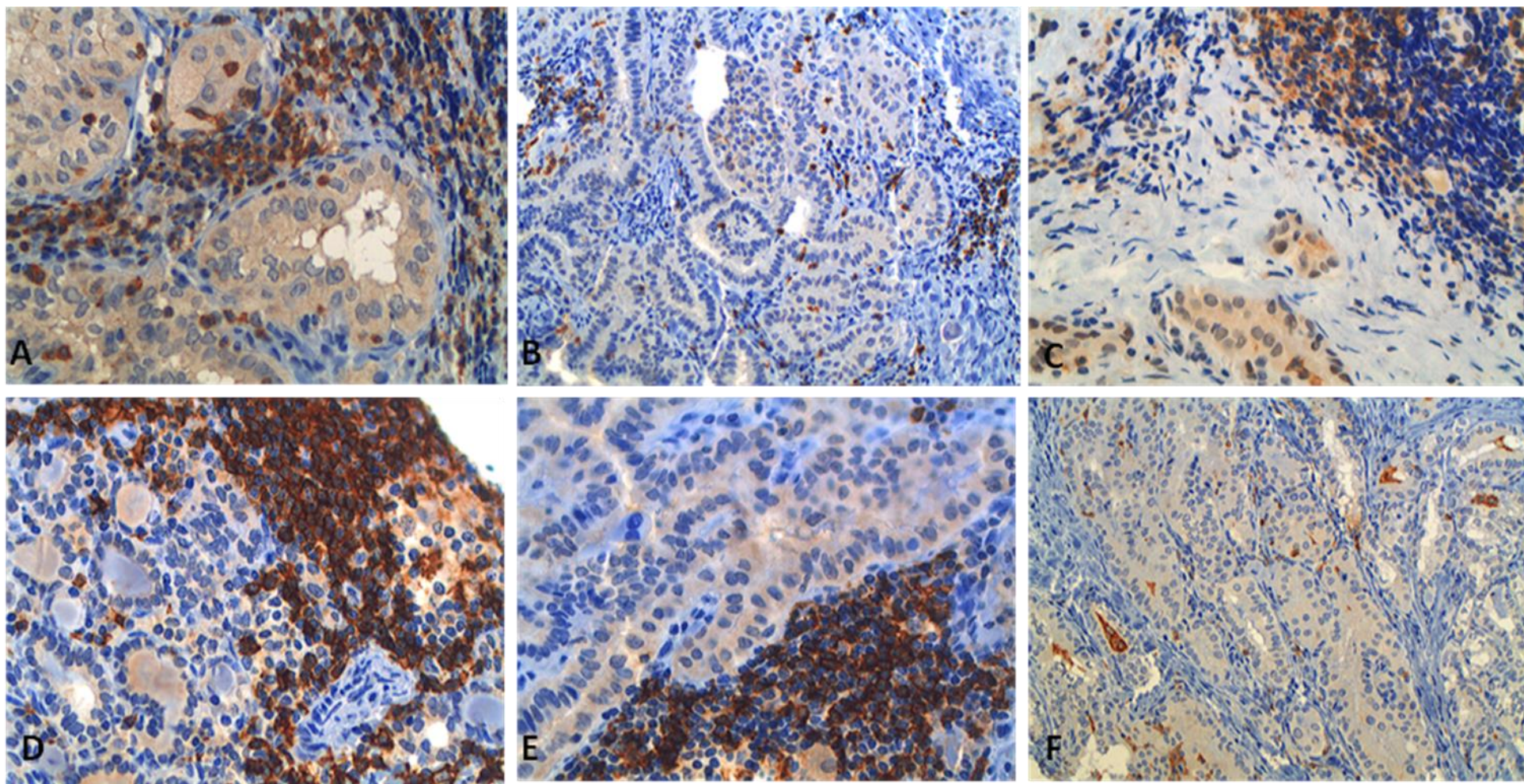
Marcador	Clone	Diluição	Empresa	Célula do sistema imune marcada/Linhagem celular de origem	Localização celular
CD3	Policlonal de Coelho	1:500	DAKO	Linfócitos Pan-T	Predominantemente Membrana plasmática
CD20	Monoclonal L26	1:1000	DAKO	Linfócitos B	Membrana plasmática
CD4	Monoclonal 1F6	1:100	Novocastra	Linfócitos T helper	Membrana plasmática
CD8	Monoclonal SP16	1:100	Thermo Scientific	Linfócitos T citolíticos	Membrana plasmática
CD68	Monoclonal KP1	1:1000	DAKO	Macrófagos	Citoplasma
FoxP3	Monoclonal 236A/E7	1:500	Abcam	Linfócitos T regulatórios	Núcleo
CD56	Monoclonal 123C3	1:100	DAKO	Biomarcador tumoral expresso na maioria das células de linhagem neuroectodérmica	Membrana plasmática
NIS	Monoclonal FP5A	1:1000	Chemicon International	Transportador de sódio/iodeto, expresso em células foliculares tireoideanas, células da glândula mamária e glândula salivar.	Membrana plasmática
MUC1	Monoclonal VU4H5	1:700	Santa Cruz Biotechnology	Mucina 1 é aberrantemente expressa em carcinomas	Citoplasma
PTEN	Monoclonal 28H6		Novocastra	Gene supressor tumoral, do ingles Phosphatase and tensin homolog.	Núcleo
ATM	Monoclonal Y170		Epitomics	Gene supressor tumoral envolvido no reparo aos danos ocorridos na molécula de DNA.	Núcleo
IL-17*	Policlonal H-132	1:200	SantaCruz Biotechnology	Citocina que induz secreção de IL-6 e IL-8	Citoplasmático e extracelular
CD4*	Monoclonal 0.N.52	1:200	SantaCruz Biotechnology	Linfócito T auxiliary	Membrana plasmática
CD11b*	Monoclonal 2Q902	1:50	Abcam	Marcador de células da linhagem mielóide	Membrana plasmática
CD33*	Policlonal H-110	1:50	SantaCruz Biotechnology	Marcador de células progenitoras	Membrana plasmática

Informações dos fabricantes: DAKO (Carpenteria, CA, EUA), Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK), Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA), Chemicon International (Temecula, CA, EUA), SantaCruz Biotechnology (SantaCruz, CA, EUA), Abcam (Cambridge, UK) and Epitomics (Burlingame, CA, EUA).

\*Usado para imunofluorescência.

## **Avaliação da IQ**

O resultado das reações imunoistoquímicas foi avaliado com auxílio do professor José Vassallo. As células foram consideradas positivas para os marcadores imunoistoquímicos quando uma coloração marrom clara foi observada na típica localização celular. A avaliação dos marcadores de células do sistema imunológico foi feita para cada amostra tecidual, estimando o número de células positivas. O número de células positivas foi classificada como: 0 = nenhuma célula positiva, 1 = até 10 células positivas, 2 = mais de 10 células positivas. A figura 5 mostra um painel da infiltração de algumas destas células do sistema imunológico.



**Figura 5:** Painel de células do sistema imunológico em carcinomas papilíferos da tireoide. Todas as imagens correspondem à reatividade imunoistoquímica para cada um dos marcadores, evidenciada pela coloração marrom na membrana dos linfócitos (A) Infiltração de linfócitos CD3+ (400x), que é um marcador pan-T. (B) Infiltração intra tumoral de linfócitos T CD8+. Linfócitos T CD8+ (T citotóxicos) infiltram-se de modo esparsos entre as papilas. (C) Infiltração de linfócitos T CD4+ (T auxiliares; 400x). (D) e (E) Infiltração de linfócitos CD20+ (linfócitos B). (F) Infiltração de macrófagos (50x).

Nosso grupo já havia estudado previamente a expressão imuno-histoquímica de MUC1, ATM, PTEN e NIS. B7-H1, MUC1, ATM e PTEN foram avaliados pela estimativa da porcentagem de células tumorais positivas e a intensidade da coloração. A porcentagem de células positivas foi classificada como: 0 = nenhuma célula positiva, 1 = até 25% de células positivas, 2 = 25-50% de células positivas, 3 = 50-75% de células positivas, 4 = mais de 75% de células positivas. A intensidade foi classificada como: 0 = negativo, 1 = leve coloração, 2 = moderada coloração, 3 = forte coloração. A pontuação final foi calculada somando os dois, a porcentagem de células positivas e a intensidade da marcação, que variou entre 0 e 2-7. Para fins estatísticos, os casos classificados como 0,1 e 2 foram agrupados e chamados de "negativo" e os casos marcou 3-7 foram chamados de "positivo".

A expressão de NIS foi avaliada para cada amostra, de acordo com a porcentagem de células foliculares com coloração NIS positiva. O principal critério para marcação com NIS como positivo foi a presença de imunorreatividade de membrana plasmática, uma vez que é essencial para NIS para ser funcional, como apontado por Castro et al (112). Os tumores que apresentavam células NIS positivas foram considerados como "positivo".

A expressão de CD56 foi avaliada para cada amostra, de acordo com a porcentagem de células foliculares com coloração CD56 positiva. A porcentagem de células positivas foi classificada como: 0 = nenhuma célula positiva, 1 = até 10% de células positivas, 2 = 10-30% de células positivas, 3 = mais de 30% de células positivas.

### **Extração de RNA**

Após a homogeneização em trizol, as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente (15-30°C) para permitir a completa dissociação dos complexos de

nucleoproteínas. Foi adicionado às amostras 0,2 mL de clorofórmio / 1 mL de Trizol agitando-se vigorosamente por 15 segundos, com posterior incubação em temperatura ambiente por 3 minutos. O material insolúvel foi precipitado por centrifugação a 12.000g, por 15 minutos, a 4 °C. Após centrifugação as amostras apresentaram duas fases: uma inferior de coloração rosada, denominada orgânica (na qual está solubilizado o DNA) e uma superior mais clara, denominada aquosa (na qual está solubilizado o RNA), e que abrange cerca de 2/3 do volume total. Houve ainda uma interface contendo proteínas, entre a fase inferior e a superior. Dessa forma, o sobrenadante (contendo o RNA), foi transferido para outro tubo e precipitado com 0,5 ml de isopropanol por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de etanol 75 % e centrifugado a 7.500 g, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de etanol 100 % e centrifugado a 7.500 g, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (contendo RNA) foi seco à temperatura ambiente. O RNA foi eluído em 30 µL de água *RNase-free* e quantificado em espectrofotômetro a 260nm. A integridade do RNA obtido foi verificada submetendo as amostras à espectrofotometria.

### **Reação de transcrição reversa**

O procedimento de análise de expressão gênica foi realizado pelo aluno de mestrado com auxílio da aluna Marjory Alana Marcello. A fita-molde de cDNA foi obtida através de uma reação de transcrição reversa. As amostras foram digeridas com DNase I Amplification Grade (Life Technologies, Rockville, MD, EUA) e a transcrição reversa foi feita usando SuperScript ® III da transcriptase reversa (Invitrogen Life Technologies Inc). Para a reação, foram utilizados 2µL de *Buffer RT* 10X, 0,8µL de dNTP 25X (100mM), 2µL de *Random primers* RT 3µg/µL, 1µL

de *Reverse Transcripase*, 8,2µL de água e 6µL de RNA. As amostras foram amplificadas em termociclador com ciclos de 25°C por 10', 2x(37°C 60'), 85°C por 10' e 4°C ∞. O cDNA obtido foi utilizado na reação do PCR em tempo real.

### **PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR**

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan<sup>TM</sup> (*Applied Biosystems*), que é constituído por um par de oligonucleotídeos e uma sonda marcada com um fluoróforo. Foram utilizadas as seguintes análises:

- Gene GAPDH: Hs02758991\_g1
- Gene β-actina: Hs99999903\_m1
- Gene B7-H1: Hs01125299\_m1\*

Os genes *GAPDH* e β-actina (*TaqMan<sup>TM</sup> - Applied Biosystems*) foram inicialmente escolhidos como controles endógenos da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. Antes de iniciar o experimento de quantificação relativa da expressão dos genes acima, foi feita a validação do sistema para o gene alvo e para os possíveis controles endógenos, para verificar se as eficiências de amplificação foram semelhantes e próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse. A validação consiste na amplificação dos cDNAs das triplicatas de 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 3 vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente, tanto com os oligonucleotídeos do gene de interesse quanto do controle endógeno. O controle endógeno que apresentasse melhor eficiência de amplificação e menor variação da expressão absoluta, portanto maior estabilidade,



seria eleito como o controle endógeno ideal para as seguintes reações.

Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente). Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência de um sistema é calculada através da fórmula:  $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ . Para a placa de validação dos genes foram feitas triplicatas da amostra de cDNA de hipotálamo referentes aos tratamentos citados acima em 7 concentrações diferentes.

Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e dos controles endógenos, foi construído um gráfico de dispersão, o qual teve por finalidade definir a amplitude de concentrações para as quais o sistema será eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores e a equação de reta na qual foi possível verificar o valor da inclinação desta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiveram mais próximos à linha de tendência foram considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações). O gene GAPDH foi considerado mais estável que a  $\beta$ -actina e toda a análise foi feita considerando como controle endógeno o gene GAPDH.

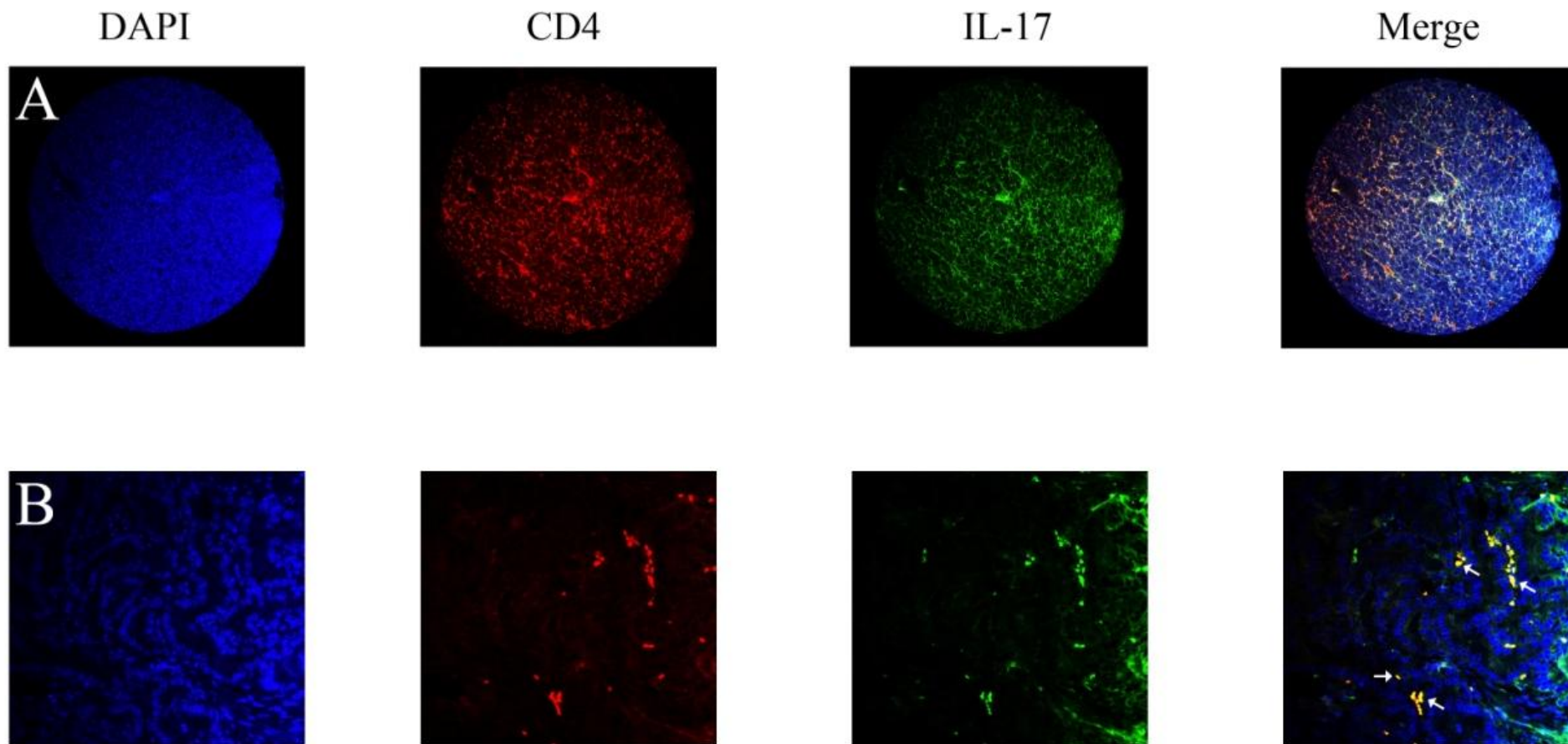
Para a quantificação relativa do gene em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 5µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x*, 0,5µL da solução de oligonucleotídeo e sonda, 0,5µL de água e 4,0µL de cDNA. Os ciclos utilizados no termociclador foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software (Applied Biosystems)*.

### **Imunofluorescência de dupla coloração**

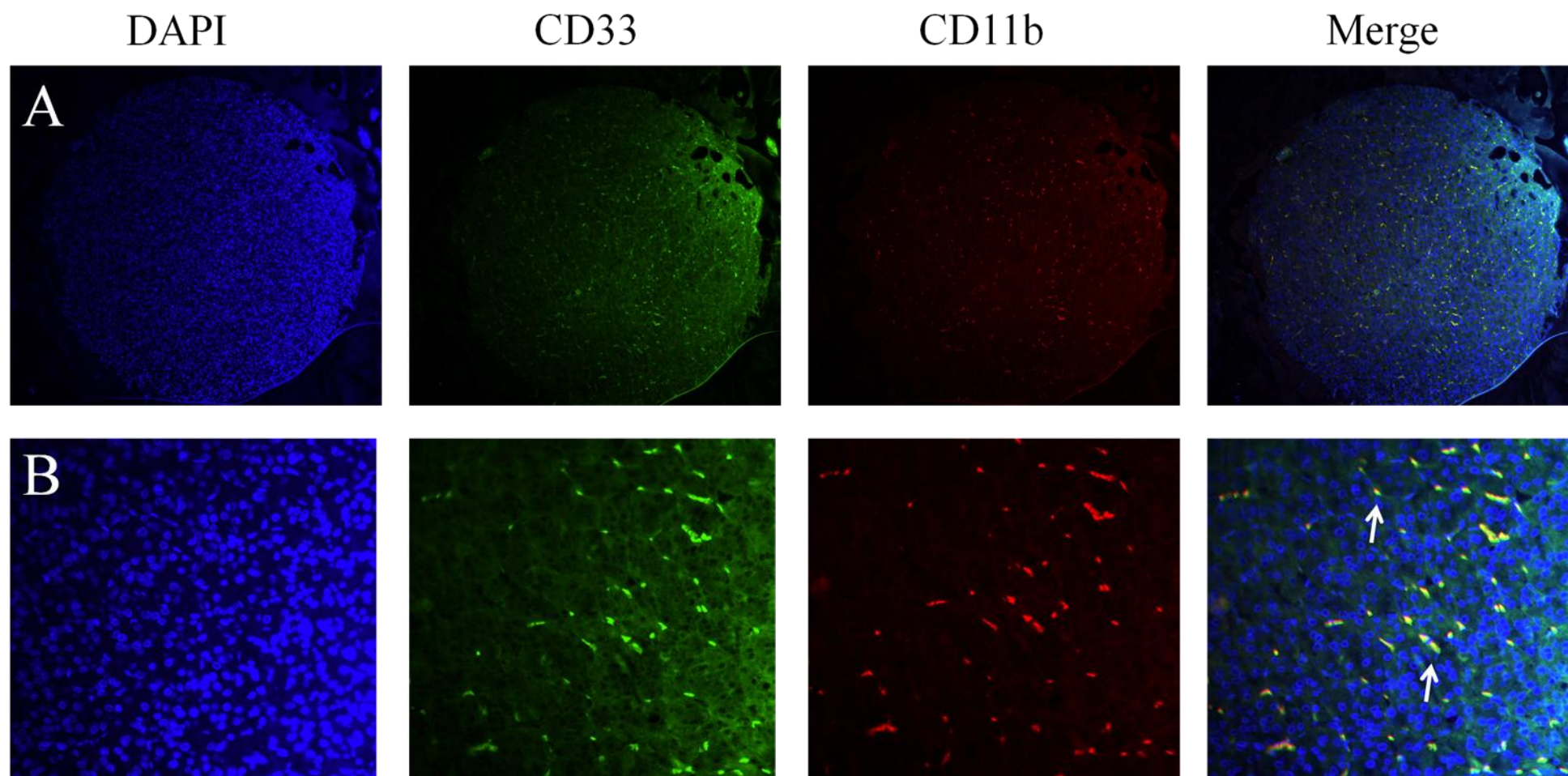
Após um repouso de aproximadamente 24h a 60°C (para completa fixação dos cortes) as lâminas com os cortes de TMA foram desparafinizadas por 5 minutos com xilol, reidratadas em diferentes concentrações de álcool etílico (100%, 95%, 80% e 70%), e lavadas três vezes por 5 minutos com PBS 0,1M, pH 7,4. Os cortes foram tratados com Triton X-100 2% por 10 min e novamente lavados três vezes por 5 minutos com PBS 0,1M, pH 7,4. As lâminas foram incubadas por 1-2h em solução contendo leite desnatado a 5% para bloquear a ligação inespecífica do anticorpo, seguidas então pela exposição por 12-16h a 4°C, em câmara úmida, a um painel de anticorpos primários: Anti-CD4 (sc-70660 mouse) e Anti-IL-17 (sc-7927 rabbit), para identificação de linfócitos Th17 (Figura 6); Anti-CD11b (ab63317 mouse) e Anti-CD33 (sc-28811 rabbit), para identificação de MDSCs (Figura 7). Posteriormente, as mesmas lâminas foram incubadas com anticorpos secundários FITC-conjugados ou rodamina-conjugados. Em seguida, as lâminas foram coradas com corante nuclear DAPI e montadas adequadamente para análise. Usamos amostras de tecido tireoidite de Hashimoto e medula óssea como controle positivo para identificação de linfócitos Th17 e MDSCs, respectivamente. As imagens foram



obtidas usando o Microscópio Laser Confocal (LSM510, Zeiss, New York, NY, USA) e as análises documentadas utilizando-se o *software Leica LAS 3.6*. Imagens representativas da dupla marcação de todos os tecidos foram obtidas e o número absoluto de células por spot de TMA foi quantificado com auxílio do programa ImageJ.



**Figura 6:** Linfócitos CD4+/IL-17+ infiltrando tecido de carcinoma papilífero da tireoide, demonstrado por colocalização de CD4 e IL-17 por imunofluorescência. Paine A: imagens de TMA para linfócitos CD4+/IL-17+ em carcinoma papilífero (aumento de 50x). Paine B: Carcinoma papilífero com linfócitos CD4+/IL-17+ (aumento de 400x). Flechas brancas indicam linfócitos Th17 (CD4+/IL-17+). O núcleo de células de carcinoma papilífero foram caracterizados por típica aparência e foram facilmente distinguidos dos linfócitos infiltrantes de tumores. Linfócitos CD4+/IL-17+ foram encontrados com células isoladas ou mesmo agrupamento de células infiltrando áreas tumorais. Merge= sobreposição.



**Figura 7:** Células CD33+/CD11b+ (MDSCs) infiltrando tecido de carcinoma papilífero da tireoide, demonstrado por colocização de CD33 e CD11b por imunofluorescência. Paine A: imagens de TMA para MDSCs em carcinoma papilífero (aumento de 50x). Paine B: Carcinoma papilífero com MDSCs (aumento de 400x). Flechas brancas apontam para células que coexpressam os dois marcadores e, portanto, são MDSCs. Merge= sobreposição.

## **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através do SAS System for Windows (Statistical Analysis System, versão 9.1.3, o Service Pack 3. Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, EUA). Sobrevida livre de recorrência foi calculada utilizando-se curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, com análise de log-rank. Análise não paramétrica foi realizada utilizando Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado. Um modelo de regressão logística multivariada foi aplicado usando o tipo de tumor (carcinoma papilífero ou folicular) como variável dependente e expressão de proteínas e fatores de risco clínico, incluindo sexo e idade como variáveis explanatórias. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar medidas contínuas entre dois grupos cuja variável não apresentava distribuição normal; Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar três ou mais grupos cujas variáveis não apresentaram distribuição normal. Teste T ou teste ANOVA foram utilizados para variáveis que apresentavam distribuição normal, comparando dois ou três ou mais grupos, respectivamente. Sensibilidade, especificidade e valor preditivo de marcadores de células imunes e marcadores tumorais para predizer malignidade foram avaliadas. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de  $p=0,05$ .

## ***RESULTADOS***

---

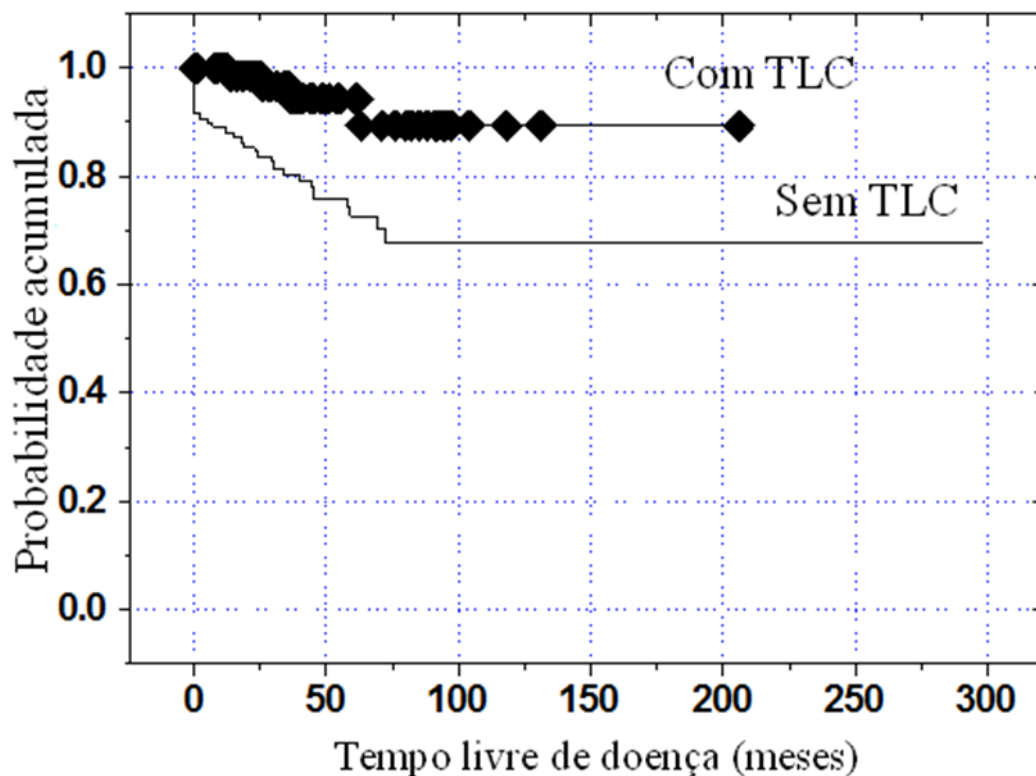
A tabela 3 resume as características clínicas dos pacientes estudados. Como esperado, a maioria dos pacientes eram do sexo feminino (n = 333), mas 16,33% dos pacientes eram do sexo masculino (n = 65). Entre os pacientes com doença benigna da tireoide, a idade média no momento do diagnóstico foi de  $49,29 \pm 15,18$  (média  $\pm$  desvio padrão) anos, mas entre aqueles com o CDT, a idade média foi de  $43,66 \pm 15,91$  anos. De acordo com o sistema de estadiamento patológico TNM (pTNM) (113), 143 CDT (15,35%) estavam no estágio IV no momento do diagnóstico. Vinte e cinco pacientes não tinham informações suficientes ou eram duvidosas para a classificação pTNM. Estes pacientes foram excluídos de todas as comparações de dados estatísticos relativos a estadiamento ou dados em que a classificação pTNM poderia interferir.

**Tabela 3:** Perfil clínico dos pacientes e características anatomopatológicas dos tumores estudados. Uma fração significativa dos pacientes (157 casos) apresentaram se em estadiamento I, sugerindo um perfil de baixa agressividade.

Características clínicas e anatomopatológicas	Número de pacientes
<b>Estadiamento</b>	
I	157
II	28
III	40
IV	41
<b>Cápsula</b>	
Encapsulado	90
Não Encapsulado	176
<b>Invasão extratireoideana</b>	
Com invasão	108
Sem invasão	158
<b>Multifocalidade</b>	
Unifocal	148
Multifocal	118

*TLC concomitante está correlacionada a características clínico-patológicas e a parâmetros imunológicos e moleculares de CDT.*

A presença da TLC concomitante foi correlacionada a características de melhor prognóstico. TLC foi mais freqüente entre as mulheres ( $p=0,0274$ ), em tumores menos agressivos que não apresentavam invasão extratireoideana ( $p=0,0028$ ) ou metástases ao diagnóstico ( $p=0,0026$ ), e em tumores pequenos, menores que 2 cm ( $p=0,0110$ ). O teste de Log-rank confirmou que a ausência da TLC foi mais freqüente entre os pacientes que tiveram recorrência (Figura 8,  $p=0,00149$ ). Nós não encontramos nenhuma associação entre níveis de TSH e da presença da TLC. TLC não se correlacionou com multifocalidade nem presença/ausência de invasão capsular.



**Figura 8:** Curva de Kaplan-Meier mostrando aumento do tempo livre de doença em pacientes com TLC concomitante ao CDT. Abreviaturas: TLC, Tireoidite linfocítica crônica; CDT, carcinoma diferenciado de tireóide.

TLC concomitante foi mais freqüente em tumores positivos para MUC1 ( $p=0,0011$ ), NIS ( $p=0,0061$ ) e CD56 ( $p=0,0022$ ). Os tumores que apresentavam TLC concomitante também apresentaram infiltração de macrófagos ( $p=0,0104$ ), linfócitos CD3+ ( $p<0,0001$ ), linfócitos CD4+ ( $p<0,0001$ ), CD8+ ( $p=0,0012$ ), e CD20+ ( $p<0,0001$ ). Análise de regressão multivariada mostrou uma associação significativa entre a presença de TLC concomitante e ausência de expressão de ATM ( $p=0,03913$ ), enquanto a presença da TLC concomitante foi encontrada mais freqüentemente em tumores que expressavam NIS ( $p=0,00653$ ), com infiltração de linfócitos CD20+ ( $p=0,00487$ ) e com infiltração de linfócitos CD3+ ( $p=0,00003$ ).

*Infiltração de macrófagos está associada a características clínicas e patológicas dos pacientes e com o perfil imunológico e molecular dos tumores.*

Foram avaliados a presença de infiltração intratumoral de células CD68+ (macrófagos). Os macrófagos não foram encontrados no tecido tireoidiano normal, mas foram detectados em 179/218 (82,11%) dos tecidos malignos. Os macrófagos também foram detectados em parte dos tecidos benignos, aparecendo em 39/115 (33,91%) dos tecidos não-malignos ( $p < 0,0001$ ), principalmente em adenomas foliculares. A tabela 4 resume as relações significativas encontradas entre os diferentes diagnósticos histopatológico.



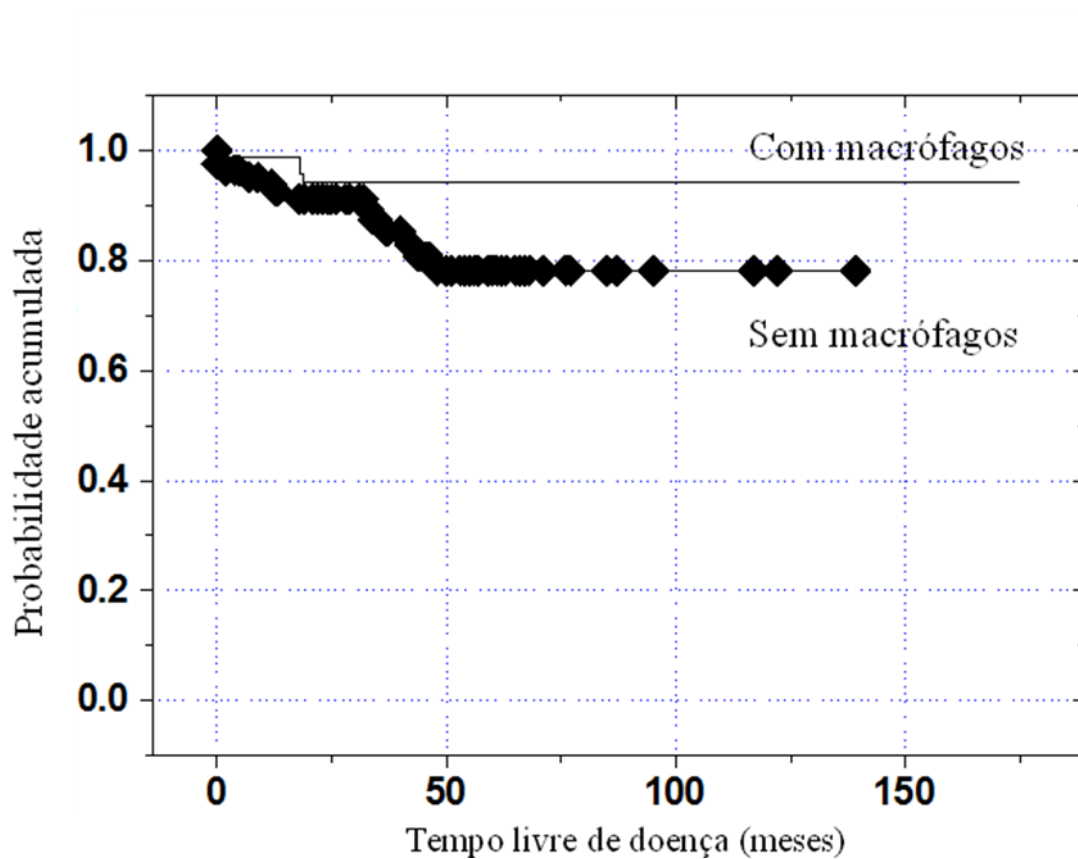
**Tabela 4:** Relações significativas encontradas entre os diferentes diagnósticos histopatológicos, de acordo com a análise de marcadores de células imunológicas.

Grupos analisados	Parâmetros estatísticos	Macrófagos	Linfócitos CD3+	Linfócitos CD4+	Linfócitos CD8+	Linfócitos CD20+	Linfócitos FoxP3+	Linfócitos CD4+/IL-17+	MDSCs
Tecido maligno vs, tireoide normal + lesões benignas	Acurácia (%)	76,58	68,98	39,73	45,37	49,18	40,26	67,68	64,01
	Sensibilidade (%)	82,11	94,12	15,46	23,29	23,12	11,79	98,22	65,90
	Especificidade (%)	66,09	59,17	98,82	96,81	98,17	100,00	12,77	60,60
	PPV (%)	82,11	47,34	96,97	94,44	95,83	100,00	66,94	75,16
	NPV (%)	66,09	96,27	32,43	35,14	41,15	35,07	80,00	49,56
	valor de p	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,0005
Maligno vs Benigno	Acurácia (%)	75,85	68,14	38,97	43,75	47,99	38,89	69,02	63,11
	Sensibilidade (%)	82,11	59,17	15,46	23,29	23,12	11,79	98,22	65,90
	Especificidade (%)	62,86	93,51	97,59	96,47	97,98	100,00	11,63	57,30
	PPV (%)	82,11	96,27	94,12	94,44	95,83	100,00	68,60	76,22
	NPV (%)	62,86	44,72	31,64	32,8	38,8	33,45	76,92	44,72
	valor de p	<0,0001	<0,0001	0,001	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,0014	0,0048
AF vs, CPTVF vs, CF	valor de p	0,0057	<0,0001	0,0525	0,0044	0,0014	0,0577	0,1299	0,0196
CPT vs, CF	Acurácia (%)	73,85	56,42	34,3	40,64	40,2	69,34	20,12	48,22
	Sensibilidade (%)	84,27	59,55	18,67	27,68	27,33	0,00	96,97	37,10
	Especificidade (%)	27,5	42,5	97,56	95,24	94,74	85,47	1,47	51,10
	PPV (%)	83,8	82,17	96,88	96,08	95,65	0,00	19,28	16,45
	NPV (%)	28,21	19,1	22,86	23,81	23,53	78,61	66,67	75,79
	valor de p	0,1077	0,8596	0,0073	0,0009	0,0024	0,0055	0,4811	0,0481

AF vs, CF	Acurácia (%)	61, 50	76,92	55,43	55,79	60,87	57,89	50,00	49,33
	Sensibilidade (%)	72,5	57,5	2,44	4,76	5,26	0,00	96,97	51,40
	Especificidade (%)	52,73	92,16	98,04	96,23	100	100,00	12,20	47,60
	PPV (%)	52,73	85,19	50	50	100	50,00	47,06	45,02
	NPV (%)	72,5	73,44	55,56	56,04	60	57,89	83,33	53,98
	valor de p	0,0203	<0,0001	1	1	0,1679	-	0,2163	0,2714

Notas: \* Considerado positivo os casos com mais de 10 células. Abreviaturas: PPV, valor preditivo positivo; NPV, valor preditivo negativo; CPTVF, variante folicular do carcinoma papilífero da tireóide; AF, adenoma folicular; CF, carcinoma folicular; CPT, carcinoma papilífero da tireóide.

Infiltração de macrófagos (classes 1 + 2) foi mais freqüente entre as mulheres ( $p=0,0393$ ). Teste ANOVA evidenciou que a idade média ao diagnóstico foi diferente entre os pacientes com classes 0, 1 e 2. De fato, teste T confirmou que pacientes com infiltração de macrófagos eram mais jovens ( $44,11 \pm 14,99$ ) do que pacientes que não apresentam infiltração de macrófagos ( $52,09 \pm 15,05$ ,  $p=0,0056$ ). Macrófagos estavam presentes em 83/106 (78,30%) dos tumores sem metástases ao diagnóstico e em 45/49 (91,84%,  $p=0,0421$ ) dos tumores com metástase ao diagnóstico. Teste de log-rank mostrou que a infiltração intensa (mais de dez macrófagos no tecido tumoral) foi associada à sobrevida livre de recidiva (Figura 9,  $p=0,04963$ ).



**Figura 9:** Curva de Kaplan-Meier mostrando aumento do tempo livre de doença em pacientes com macrófagos infiltrantes de tumores.

Tabela 5 resume as associações significativas entre os macrófagos, os marcadores de tumores e células do sistema imunológico. Infiltração de macrófagos foi mais freqüente em tumores que expressam MUC1 e ATM. Os tumores que apresentavam infiltração de macrófagos também apresentaram infiltração de linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e CD20+.

**Tabela 5:** Relações encontradas entre os diferentes marcadores em amostras de CDT. Os dados estão expressos em valor de p (nível de significância).

Células do sistema imunológico	Marcador tumoral						Células do sistema imunológico							
	MUC1	ATM	PTEN	NIS	B7-H1	CD56	FoxP3+	MDSCs	Th17	CD20+	CD8+	CD4+	CD3+	Macrófagos
Macrófagos	<0,0001	<0,0001 <sup>a</sup>	NS	NS	< 0,0001	NS	<0,0001	NS	NS	0,0039	0,0012	0,0338	<0,0001	x
CD3+	<0,0001	NS	0,0834	NS	NS	NS	<0,0001	0,0071	NS	0,0001	0,0012	0,0001	X	x
CD4+	<0,0001	0,0013 (0,0455)	NS	NS	0,04942	0,0058	<0,0001	0,03153	NS	<0,0001	<0,0001	x	X	x
CD8+	0,0009	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0005	0,017	<0,0001	0,00249	0,0144 <sup>a</sup>	<0,0001	x	x	X	x
CD20+	<0,0001	<0,0001	NS	0,0029	0,0032	0,0284	<0,0001	0,0181	NS	x	x	x	X	x
Th17	NS	0,0079 <sup>a</sup>	NS	NS	NS	0,0283	NS	<0,0001	X	x	x	x	X	x
MDSCs <sup>b</sup>	NS	NS	NS	0,02747	0,03256	NS	0,04414	X	X	x	x	x	X	x
FoxP3+	0,0044	<0,0001	NS	0,0203	0,0092	0,0005	x	X	X	x	x	x	X	x

Nota: a= comparação feita usando as categorias “menos que 10 células” vs, “mais que 10 células”, b= resultados da análise quantitativa. Abreviaturas: NS, não significante; CDT, carcinoma diferenciado de tireóide; MDSCs, células supressoras derivadas da linhagem mielóide.

*Infiltração de linfócitos CD3+ se correlaciona à malignidade e está associada à presença de metástases ao diagnóstico.*

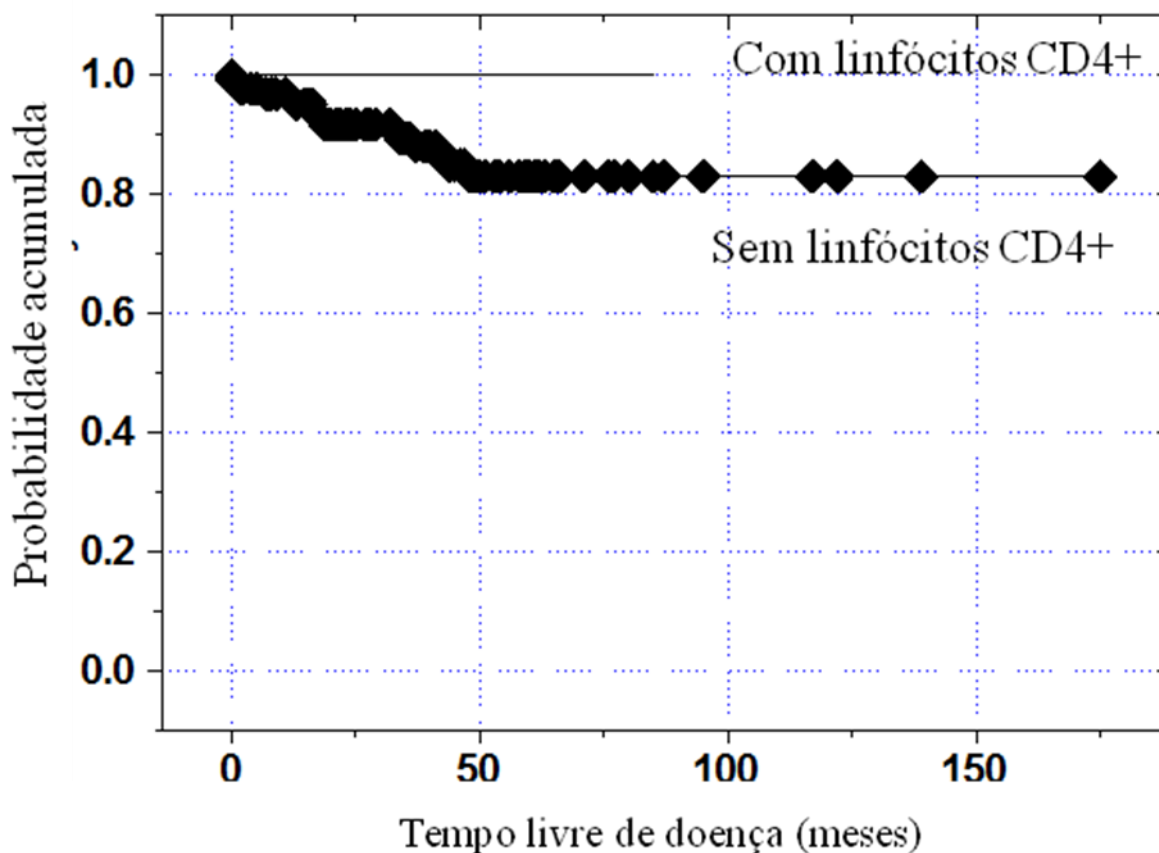
Investigamos a presença de marcador CD3+ (marcador pan linfócitos T) em tecidos de tireoide. Nenhum dos oito tecidos tireoideanos normais investigados apresentaram infiltração de linfócitos CD3+. Apenas 1/26 bócios e 4/51 adenomas apresentaram mais de 10 células positivas, enquanto que 25/26 bóci e 47/51 adenomas não apresentaram células CD3+. Infiltração de células CD3 + ocorreu em 59,17% dos tecidos malignos ( $p < 0,0001$ ), mas não diferiu entre CPT e CF ( $p = 0,8596$ ). A presença de infiltração linfocítica de células CD3+ diferenciou lesões foliculares adenomas, CPTVF e CF ( $p < 0,0001$ ). A infiltração de células CD3+ foi muito mais freqüente entre CF do que entre os casos de adenoma ( $p < 0,0001$ ), diferenciou os casos CPTVF de adenoma ( $p < 0,0001$ ), mas não diferenciou CPTVF de CF ( $p = 0,5309$ ).

Sessenta e dois dos 98 (63,26%) tumores não-encapsulados apresentaram infiltração de células CD3+. Entretanto, apenas 18/48 (37,50%) dos tumores encapsulados apresentaram infiltração de CD3+ ( $p = 0,0045$ ). Cinquenta e um de 106 (48,11%) tumores que não apresentavam metástases ao diagnóstico apresentaram infiltração de células CD3+, enquanto que 36/50 (72%) dos tumores que apresentavam metástases ao diagnóstico tiveram infiltração linfocítica de células CD3+ ( $p = 0,0058$ ). Infelizmente, o teste de log-rank não foi capaz de identificar a infiltração de células CD3 + linfocitária como marcador de prognóstico.

Infiltração de linfócitos CD3+ se correlacionou com a positividade para MUC1 ( $p < 0,0001$ ). Os tumores que apresentavam infiltração de linfócitos CD3 + também apresentavam infiltração de macrófagos, linfócitos CD4 +, CD8 + e CD20 + como retomado na tabela 5.

*A infiltração de linfócitos CD4 + está relacionada às características de melhor prognóstico e perfil imunológico e molecular dos tumores.*

Nenhum dos tecidos normais da tireóide apresentou infiltração linfocitária CD4+. Apenas 1/32 (3,12%) bócio e 1/51 (1,96%), adenoma folicular apresentaram linfócitos CD4+, enquanto 32 das 207 amostras malignas (15,45%) apresentaram linfócitos CD4+, distinguindo tumores benignos (2,41%) de tumores malignos (15,45%  $p=0,0010$ ). De fato, a quase ausência de linfócitos CD4 + em amostras não-malignas de tireoide conferiu alta especificidade (98,82%) e bom valor preditivo positivo (96,7%) de malignidade. Entretanto, encontramos baixa sensibilidade (15,46%), baixo valor preditivo negativo valor (32,43%) e baixa acurácia (39,73%). Linfócitos CD4+ foram mais freqüentes nos tumores sem invasão extratireoideana (29,23% vs 12,94%,  $p=0,0224$ ), e em tumores menores que 4 cm (24,11% vs 7,69%,  $p=0,0345$ ). O teste log-rank indicou que a infiltração de linfócitos CD4 + tendeu a se correlacionar a maior sobrevida livre de recidiva (Figura 10,  $p=0,08229$ ).



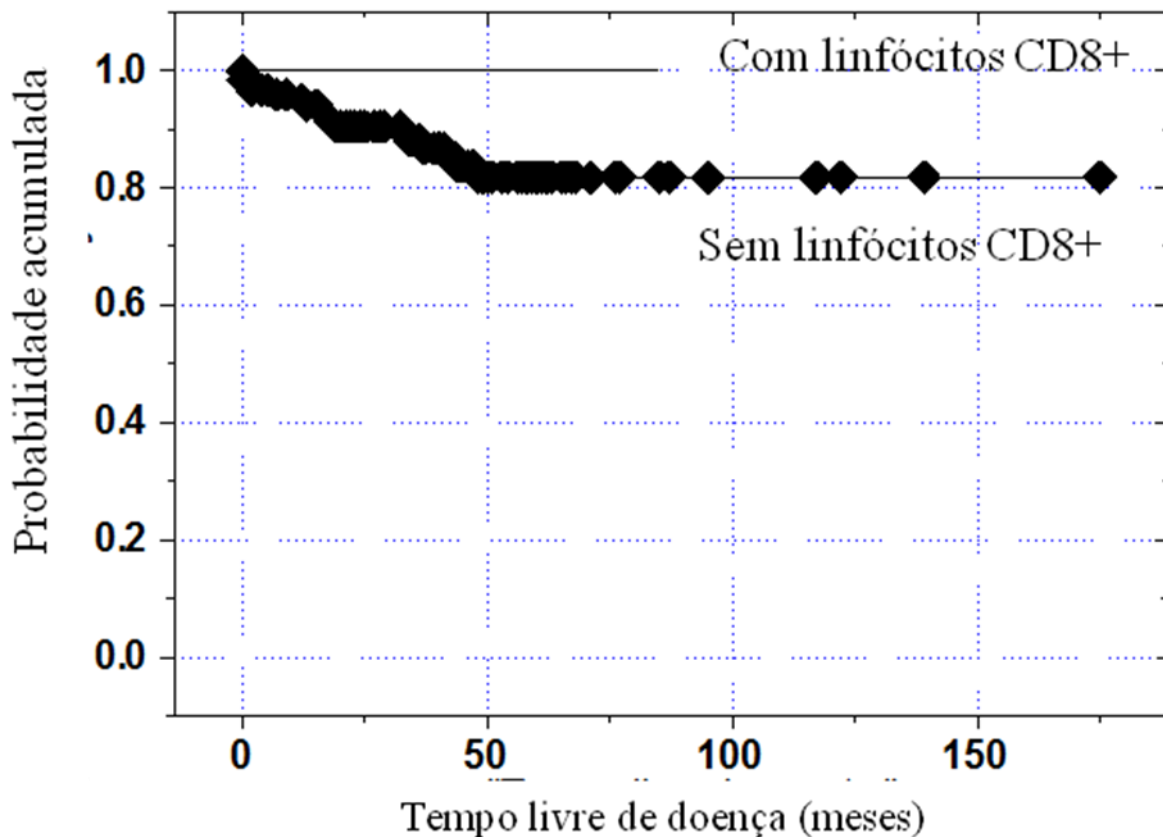
**Figura 10:** Curva de Kaplan-Meier mostrando a tendência ao aumento do tempo livre de doença em pacientes com infiltração de linfócitos CD4+.

A infiltração de linfócitos CD4+ foi mais freqüente em tumores positivos para MUC1, ATM, e CD56. Os tumores que apresentavam infiltração de linfócitos CD4+ também apresentavam infiltração de macrófagos, linfócitos CD3+, CD8+ e CD20+, como demonstrado na tabela 5.

*A infiltração de linfócitos CD8+ pode ser um marcador de prognóstico e está associada a aspectos imunológicos e moleculares de CDT.*



Oito dos nove tecidos tireoideanos normais não apresentavam linfócitos CD8+ e a amostra que foi considerada positiva apresentou poucas células espalhadas por todo o tecido tireoideano. Entretanto, 12/32 (37,5%) das amostras de bócio e 20/53 (37,74%) dos adenomas foliculares apresentaram linfócitos CD8+. A intensa infiltração de linfócitos CD8+ ocorreu mais freqüentemente em tumores malignos (51/219-23,29%) do que em amostras de tecido benigno 3/85 (3,53%;  $p<0,0001$ ). A infiltração de mais de dez linfócitos CD8+ foi mais freqüente em mulheres (29,53%) do que em homens (11,43%,  $p=0,0320$ ) e em pacientes jovens ( $p=0,0199$ ). Linfócitos CD8 + foram mais freqüentes nos tumores sem cápsula (19/46 vs 59/98;  $p=0,0480$ ), em tumores menores que 2 cm ( $p=0,0059$ ), nos tumores sem invasão extratireoideana ( $p=0,0014$ ) e em lesões unifocais ( $p=0,0482$ ). O teste de log-rank confirmou que a infiltração de células CD8 + foi associada à melhor sobrevida livre de recidiva (Figura 11,  $p=0,03119$ ).



**Figura 11:** Curva de Kaplan-Meier mostrando o aumento do tempo livre de doença em pacientes com infiltração de linfócitos CD8+.

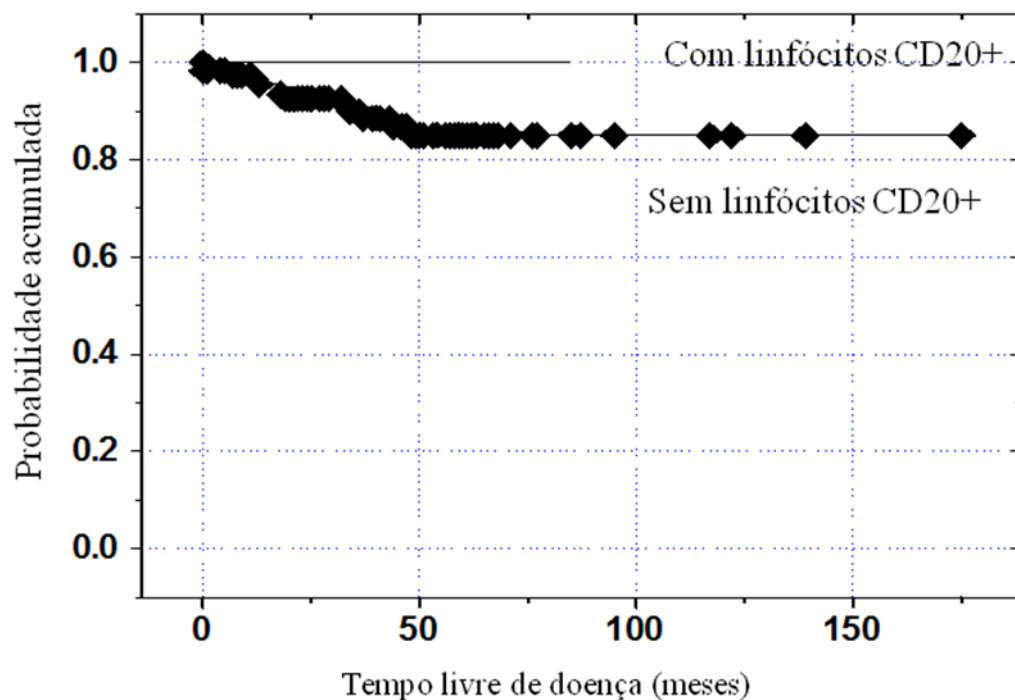
A infiltração de linfócitos CD8+ foi mais freqüente em tumores que expressavam MUC1, ATM, PTEN, NIS, e CD56. Os tumores que apresentavam infiltração de linfócitos CD8+ também apresentavam infiltração de macrófagos, linfócitos CD3+, os linfócitos CD4+ e CD20+.

*A infiltração de CD20+ está correlacionada a características clínicas e patológicas de melhor prognóstico.*

Nenhum dos 10 tecidos tireoideanos normais e nenhum dos 54 adenomas apresentaram infiltração de células CD20+. Apenas 2 dos 45 bócios apresentavam infiltrações de células

CD20+. Infiltração de células CD20+ foi detectada em 2/99 (2,02%) tecidos benignos, em contraste com 46/199 (23,12%,  $p < 0,0001$ ) tumores malignos. Além disso, a presença de CD20+ foi mais freqüente no CPT (27,33%) do que no CF (5,26%,  $p=0,0024$ ).

Dezenove dos 63 (30,16%) tumores sem invasão extratireoideana apresentavam linfócitos CD20+ enquanto que 11/81 (13,58%) casos com invasão extratireoideana apresentavam essas células ( $p=0,0221$ ). Infiltração de linfócitos CD20+ foi mais freqüentes entre os tumores menores ( $p=0,0134$ ) e houve uma tendência de associação com melhor sobrevida livre de recidiva (Figura 12,  $p=0,06663$ ). A infiltração de CD20+ foi mais freqüente em tumores que expressavam MUC1, ATM, NIS, e CD56. Os tumores que apresentavam infiltração CD20+ também apresentavam infiltração de macrófagos, linfócitos CD3+, linfócitos CD4+ e CD8+.



**Figura 12:** Curva de Kaplan-Meier mostrando a tendência ao aumento do tempo livre de doença em pacientes com infiltração de linfócitos CD20+.

*A infiltração de linfócitos CD4+/IL-17+ foi frequentemente encontrada nos tumores malignos da tireoide.*

A investigação da infiltração de linfócitos Th17 (com colocalização de CD4 e IL-17) foi feita por imunofluorescência. Seguida da técnica, foi feita a quantificação do número absoluto de células por spot. Para fins de análise estatística, consideramos três diferentes tipos de quantificação: (a) análise quantitativa pelo valor absoluto do número de células Th17 infiltrantes de tumores; (b) análise categorizada assumindo a mediana do número de células como balizador da dicotomização e (c) análise semiquantitativa tal como feita para os demais linfócitos.

A análise quantitativa mostrou que quanto mais células Th17 infiltrantes de tumores menor era a idade do diagnóstico dos pacientes (Spearman-rank;  $r=-0,2263$ ;  $p=0,00338$ ). Da mesma forma, o teste de Kruskal-Wallis mostrou que os diferentes tecidos analisados apresentavam diferentes quantidades de células Th17 ( $p<0,0001$ ). A análise de múltiplas comparações pós-teste ratificou esta diferença: CPT apresentavam mais células que tecidos normais ( $p<0,05$ ), CPTVF apresentavam mais células que tecidos normais ( $p<0,01$ ) e CPTVF apresentavam mais células que tecidos de bócio ( $p<0,01$ ). De fato, agrupando todos os tecidos malignos e todos os tecidos não-malignos, o teste Mann-Whitney mostrou que tecidos malignos apresentavam mais células que os tecidos não-malignos ( $p<0,0001$ ). Entretanto, a infiltração de células Th17 não foi considerada um bom marcador de diagnóstico, uma vez que não apresentava sensibilidade, especificidade e valores preditivos adequados (sensibilidade=0,6510; especificidade=0,6280; valor preditivo positivo=0,7591; valor preditivo negativo=0,4998). CPT apresentavam mais linfócitos Th17 do que CF ( $p=0,0339$ ) e CPTVF apresentavam mais linfócitos Th17 do que CF ( $p=0,0088$ ). Não houve associação entre o número de linfócitos Th17

e parâmetros anatomopatológicos e clínicos de agressividade tumoral. A infiltração de linfócitos Th17 foi frequentemente acompanhada da infiltração de linfócitos T CD4+ ( $p=0,00734$ ), linfócitos T CD8+ ( $p=0,00541$ ), linfócitos CD20+ ( $p=0,01149$ ) e linfócitos FoxP3+ ( $p=0,03941$ ).

Considerando tumores positivos para infiltração de linfócitos Th17 aqueles que apresentavam mais células que a mediana do número de células de todos os tecidos, pacientes positivos para infiltração de linfócitos Th17 apresentavam maior idade ao diagnóstico do que pacientes negativos para esta infiltração ( $p=0,00093$ ). O teste qui-quadrado mostrou que os diferentes tipos de tecido estudados apresentavam diferente padrão de infiltração de linfócitos Th17 ( $\chi^2=27,217$ ; graus de liberdade=6;  $p=0,0001$ ). Tecidos malignos foram mais frequentemente positivos para infiltração de linfócitos Th17 do que tecidos não-malignos ( $p=0,0002$ ). Entretanto, não houve associação significativa entre infiltração de linfócitos Th17 e característica anatomopatológicas ou clínicas de agressividade tumoral. A infiltração de linfócitos Th17 foi frequentemente acompanhada da infiltração de macrófagos ( $p=0,0455$ ), linfócitos T CD4+ ( $p=0,0056$ ), linfócitos T CD8+ ( $p=0,0298$ ), linfócitos CD20+ ( $p=0,0119$ ) e linfócitos FoxP3+ ( $p=0,0051$ ).

Prosseguimos com a análise semiquantitativa da infiltração de linfócitos Th17. Novamente, o teste qui-quadrado mostrou que os diferentes tipos de tecido estudados apresentavam diferente padrão de infiltração de linfócitos Th17 ( $\chi^2= 16,285$ ; graus de liberdade=6;  $p=0,0123$ ). Tecidos malignos foram mais frequentemente positivos para infiltração de linfócitos Th17 do que tecidos não-malignos ( $p=0,0004$ ). Não houve associação entre a infiltração de linfócitos Th17 e características anatomopatológicas de agressividade tumoral. Entretanto, o teste log-rank sugere uma discreta associação entre presença de infiltração de linfócitos Th17 e melhor prognóstico ( $p=0,06417$ ). Tumores positivos para infiltração de

linfócitos Th17 frequentemente apresentavam-se positivos para CD56 ( $p=0,0283$ ) e positivos para infiltração de linfócitos T CD8+ ( $p=0,0144$ ). Desta forma, por três análises diferentes, nossos dados sugeriram conclusões similares.

*A infiltração de células CD33+/CD11b+ foi mais freqüente em tecidos malignos.*

A investigação da infiltração de células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC; com colocalização de CD33 e CD11b) foi feita por imunofluorescência. Seguida da técnica, foi feita a quantificação do número absoluto de células por spot. Para fins de análise estatística, consideramos três diferentes tipos de quantificação: (a) análise quantitativa pelo valor absoluto do número de MDSCs infiltrantes de tumores; (b) análise categorizada assumindo a mediana do número de células como balizador da dicotomização e (c) análise semiquantitativa tal como feita para os demais linfócitos.

A análise quantitativa mostrou que pacientes da etnia caucasóide apresentavam mais MDSCs infiltrando CDT do que pacientes não caucasóides ( $p=0,04941$ ). Quanto mais MDSCs infiltrantes de tumores menor era a idade do diagnóstico dos pacientes com CDT (Spearman-rank;  $r=-0.14625$ ;  $p=0,03805$ ). O teste Kruskal-Wallis mostrou que os diferentes tipos de tecidos apresentam diferentes quantidades de MDSCs ( $p< 0,0001$ ). Os tumores malignos apresentavam mais MDSCs do que tumores não malignos ( $p=0,0004$ ). Entretanto, não houve associação entre a quantidade de MDSCs e características anatomopatológicas e clínicas de agressividade. A infiltração de MDSCs foi acompanhada de infiltração de linfócitos CD3+ ( $p=0,0071$ ), linfócitos T CD4+ ( $p=0,03153$ ), linfócitos T CD8+ ( $p=0,00249$ ), linfócitos CD20+ ( $p=0,0181$ ), linfócitos FoxP3+ ( $p=0,04414$ ) e linfócitos Th17 ( $p< 0,0001$ ).

Utilizamos a mediana do número de MDSCs como parâmetro para categorização dos casos, em que os tumores cujo número de células exceder a mediana são considerados positivos. O teste qui-quadrado mostrou que os diferentes tipos de tecido estudados apresentavam diferente padrão de infiltração de MDSCs ( $\chi^2 = 27.427$ ; graus de liberdade=6;  $p=0,0001$ ). Agrupando os casos em tecidos malignos vs não-malignos, tumores malignos eram mais frequentemente positivos para infiltração de MDSCs ( $p=0,0003$ ). Tumores positivos para MDSCs frequentemente se apresentavam sem invasão extratireoideana ( $p=0,0314$ ). A infiltração de MDSCs foi acompanhada de infiltração de linfócitos CD8+ ( $p=0,0052$ ), linfócitos CD20+ ( $p=0,0385$ ) e linfócitos FoxP3+ ( $p=0,0142$ ).

Prosseguiu-se a análise semiquantitativa, tal como feita na análise dos linfócitos. O teste qui-quadrado mostrou diferente padrão de infiltração de MDSCs entre os diferentes tecidos analisados ( $\chi^2 = 13,957$ ; graus de liberdade=6;  $p=0,0301$ ). Tumores malignos frequentemente apresentavam infiltração de MDSCs ( $p=0,0004$ ). A infiltração de MDSCs foi acompanhada de infiltração de linfócitos CD3+ ( $p=0,0284$ ) e linfócitos CD8+ ( $p=0,0050$ ). Novamente, por três análises diferentes, nossos dados sugeriram conclusões similares.

*A expressão da proteína CD56 é mais freqüente entre os tecidos benignos e não está associada ao prognóstico dos pacientes com CDT.*

Foram considerados "positivos" para CD56 os casos com imunoexpressão classes 1-3. Seis dos oito tecidos normais de tireoide foram positivos para CD56. Vinte e sete dos 47 (57,45%) bócios e 29/26 (52,73%) adenomas foram positivos para CD56. A expressão protéica de CD56 distinguiu os tecidos benignos (56/102 - 54,90%) dos tecidos malignos (69/217 - 31,80%,  $p=0,0001$ ). A sensibilidade foi de 54,90%, a especificidade foi de 68,20%, valor

preditivo positivo foi de 44,80% e valor preditivo negativo foi 76,29%. No entanto, a expressão da proteína CD56 não diferiu CPT (29,94% de positividade) e CF (40%,  $p=0,2596$ ).

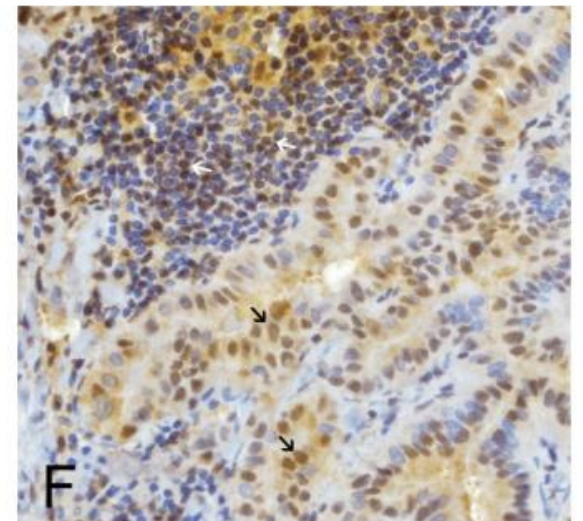
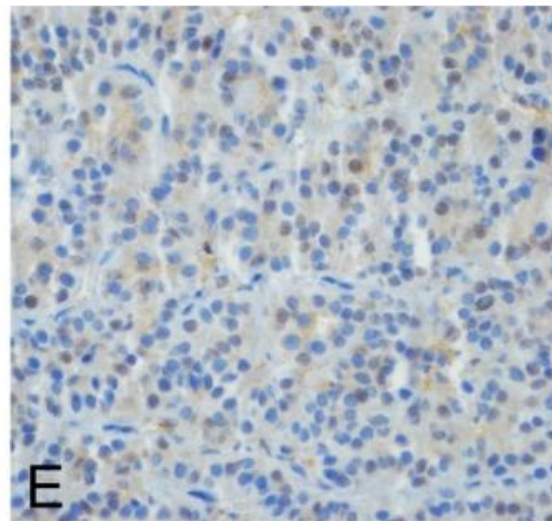
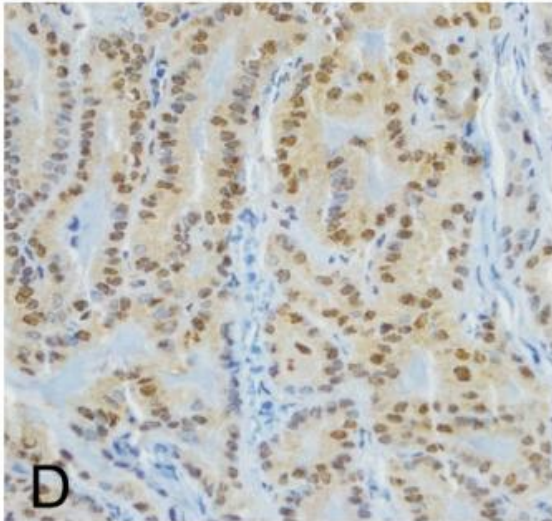
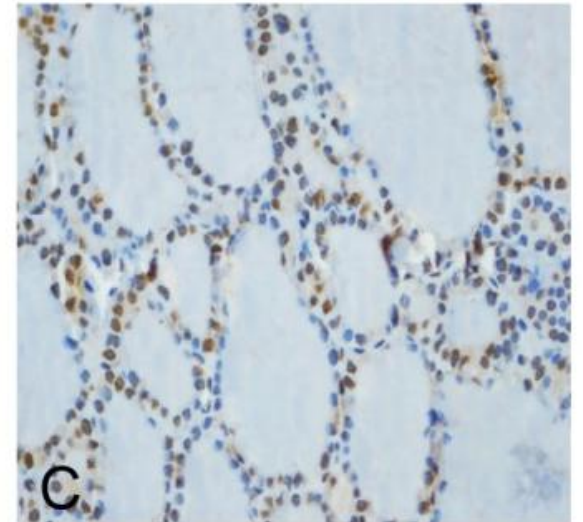
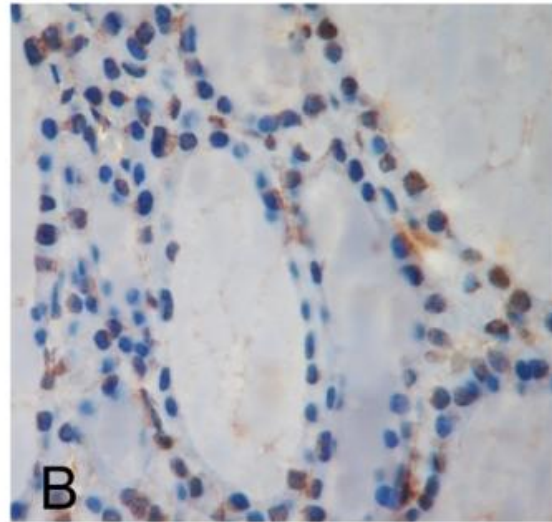
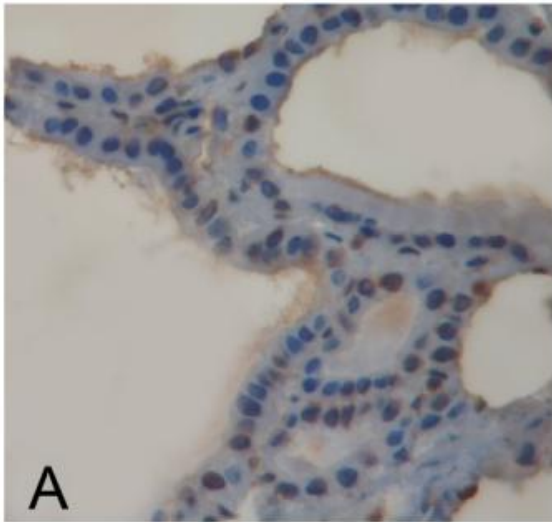
Tumores considerados classe 2 e 3 para expressão de CD56 apresentavam-se mais frequentemente com encapsulamento fibrótico ( $p=0,0399$ ) e com presença de TLC concomitante ( $p=0,0045$ ). Entretanto, não houve relação entre expressão de CD56 e demais variáveis anatomopatológicas de agressividade tumoral.

Tumores positivos para CD56 frequentemente apresentavam infiltração de linfócitos T CD4+ ( $p=0,0058$ ), linfócitos T CD8+ ( $p=0,0170$ ), linfócitos CD20+ ( $p=0,0284$ ) e linfócitos FoxP3+ ( $p=0.0005$ ).

*A infiltração de linfócitos FoxP3+ se correlaciona a características de menor agressividade tumoral.*

Nenhum dos 7 tecidos tireoideanos normais apresentaram linfócitos FoxP3+. Da mesma forma, nenhum dos tecidos benignos (0/39 bóciós e 0/55 adenomas) apresentou infiltração destes linfócitos. Por outro lado, 25/147 CPT apresentaram infiltração de linfócitos FoxP3+, como mostrado na figura 13. Curiosamente, não detectamos infiltração de linfócitos FoxP3+ em CF. A infiltração destes linfócitos se associou à ausência de invasão extratireoideana ( $p=0.0122$ ), presença de TLC concomitante ( $p=0.0002$ ), tumores menores que 2 cm ( $p=0.0078$ ).





**Figura 13:** Expressão progressiva de FoxP3 é mostrada se compararmos diferentes tecidos e lesões tireoideanos. (A) Tireoide normal com baixa marcação de FoxP3. (B) Bócio apresentando marcação intermediária. Em contraste com tireoide normal, células do bócio apresentam um aumento da expressão citoplasmática e nuclear. (C) Células de adenoma folicular apresentam uma pronunciada expressão de FoxP3 citoplasmático e nuclear. (D) Carcinoma papilífero da tireoide com uma forte expressão de FoxP3. Um aumento particular é notado na expressão de FoxP3 citoplasmático. (E) Carinoma folicular apresenta uma marcação bem atenuada em relação aos demais tecidos. (F) Carcinoma papilífero da tireoide com células tumorais positivas para FoxP3 e com infiltração de linfócitos FoxP3+. Flechas brancas apontam para linfócitos FoxP3+, que apresentam padrão de marcação nuclear, infiltrando áreas tumorais. Flechas pretas apontam para células de carcinoma papilífero da tireoide com expressão tanto citoplasmática quanto nuclear. Aumento de 400x.

A infiltração de linfócitos FoxP3+ foi mais freqüente em tumores positivos para MUC1 ( $p=0.0044$ ), ATM ( $p<0.0001$ ), NIS ( $p=0.0203$ ) e CD56 ( $p=0.0005$ ). Estes também foram mais freqüentes em tumores que também apresentaram infiltração de macrófagos, linfócitos CD3+, linfócitos CD4+, CD8+ e CD20+.

*A expressão de B7-H1 é característica de tecidos malignos e pode apontar um comportamento mais agressivo dos CDT.*

Analizamos a expressão tanto do RNAm quanto da proteína B7-H1. Os resultados da expressão do RNAm de B7-H1 foram comparados tomando esta expressão como uma variável quantitativa. Pacientes da etnia caucasóide apresentavam menor expressão de RNAm de B7-H1 do que pacientes não-caucasianos ( $p=0,02912$ ). Quanto maior era a idade do diagnóstico de CDT, maior era a expressão desta molécula (Spearman-rank;  $r= 0.2065$ ;  $p= 0,02896$ ). O teste de Kruskal-Wallis mostrou que os diferentes tecidos estudados apresentam diferentes níveis de expressão de RNAm de B7-H1 ( $p< 0,0001$ ). De fato, tecidos malignos apresentam maior expressão de RNAm de B7-H1 do que tecidos benignos ( $p= 0,0004$ ). No entanto, a expressão de RNAm de B7-H1 não foi considerada um bom marcador de diagnóstico, uma vez que não apresentava especificidade e valores preditivos adequados (sensibilidade=0,8350; especificidade=0,5760; valor preditivo positivo=0,8351; valor preditivo negativo=0,5758). Agrupando os casos com estadiamento pTNM de II a IV em uma única classe, observa-se que tumores mais agressivos de estadios avançados apresentam maior expressão de RNAm de B7-H1. Ainda, maior expressão de RNAm de B7-H1 foi encontrada em tumores que também

apresentavam infiltração de linfócitos CD3+ ( $p=0,02149$ ), linfócitos CD4+ ( $p=0,01049$ ), linfócitos CD8+ ( $p=0,01083$ ) e linfócitos FoxP3+ ( $p=0,00317$ ).

A seguir, analisamos a expressão protéica de B7-H1 por imunoistoquímica. A quantificação da expressão mostrou que os diferentes tipos de tecidos analisados não diferiam quanto à expressão de B7-H1. Ainda, não houve relação entre a expressão de B7-H1 e características clínicas e anatomopatológicas que remetam à agressividade tumoral. Entretanto, curiosamente, a expressão desta proteína foi maior entre os casos que apresentavam TLC concomitante ao tumor ( $p=0,00754$ ). A expressão de B7-H1 foi maior entre os casos que também apresentavam infiltração de macrófagos ( $p<0,0001$ ), linfócitos T CD4+ ( $p=0,04942$ ), linfócitos T CD8+ ( $p=0,0005$ ), linfócitos CD20+ ( $p=0,0032$ ) e linfócitos FoxP3+ ( $p=0,0092$ ).

*A proteína FoxP3 apresenta-se expressa em células foliculares de CDT e pode prever um comportamento mais agressivo destes tumores.*

Surpreendentemente, as células foliculares de CDT apresentaram expressão tanto nuclear, quanto citoplasmática da proteína FoxP3, como demonstrado na figura 13. Para avaliarmos os possíveis efeitos desta expressão no fenótipo dos tumores, prosseguimos com a quantificação da expressão imunoistoquímica. O software utilizado para análise é capaz de discriminar a expressão nuclear da expressão citoplasmática. Tumores de pacientes do sexo feminino tenderam a apresentar maior expressão de FoxP3 citoplasmático ( $p=0,0641$ ) e foram inversamente correlacionadas com a idade no momento do diagnóstico de CDT (Spearman-rank  $r=-0,2913$ ,  $p=0,0001$ ). O teste Kruskal-Wallis mostrou um padrão distinto de expressão FoxP3 citoplasmático entre diferentes tipos de lesões ( $p<0,0001$ ), com lesões malignas apresentando marcação mais intensa do que lesões benignas ( $p=0,0005$ ). Tecidos de

tireoides normais apresentaram a menor coloração citoplasmática ( $10,9324 \pm 4,8312$ ). Carcinomas papilíferos clássicos apresentaram valores mais elevados de marcação ( $55,880 \pm 38,650$ ) do que bócio ( $22,824 \pm 19,626$ ,  $p < 0,0001$ ) e carcinomas foliculares ( $32,560 \pm 18,923$ ,  $p = 0,0143$ ). Tumores com TLC concomitante a CDT apresentaram maior expressão de FoxP3 citoplasmático ( $67,610 \pm 42,819$ ), quando comparados com aqueles sem TLC concomitante ( $46,199 \pm 35,687$ ,  $p = 0,0043$ ).

Expressão de FoxP3 nuclear foi mais intensa em pacientes mais jovem (Spearman  $r = -0,16479$ ,  $p = 0,01562$ ), mas semelhantes em diferentes tipos de lesões ( $p = 0,5622$ ). Tumores agressivos apresentando metástases ao diagnóstico apresentaram maior expressão de FoxP3 nuclear do que lesões menos agressivas ( $p = 0,0011$ ). Entretanto, o teste log-rank não mostrou nem a marcação citoplasmática ( $p = 0,72045$ ) nem a nuclear ( $p = 0,65969$ ) como um marcador de prognóstico.

*Análise de regressão logística multivariada e regressão de Cox de riscos proporcionais revelam um padrão molecular e imunológicos associados às características clínicas e patológicas.*

Dada a grande quantidade de variáveis anatomopatológicas, clínicas e moleculares/imunológicas, foi feita análise de regressão logística múltipla, tomando como variável dependente as características anatomopatológicas e clínicas que ajudam a definir a agressividade de CDT. Assim, a presença de metástase ao diagnóstico foi determinada independentemente pela presença de invasão extratireoideana ao diagnóstico ( $p = 0,0002$ ), pelo maior tamanho do tumor primário ( $p = 0,00234$ ), pela infiltração intratumoral de macrófagos ( $p = 0,01448$ ) e pela maior expressão nuclear de FoxP3 nas células foliculares ( $p = 0,01481$ ). A

presença de encapsulamento fibrótico foi associada de forma independente à expressão de CD56 ( $p=0,0174$ ), presença de infiltração de linfócitos Th17 ( $p=0,04462$ ), presença de infiltração de linfócitos CD20+ ( $p=0,02607$ ) e menor expressão de FoxP3 nuclear em células foliculares ( $p=0,00597$ ). Da mesma forma, a presença de invasão extratireoideana foi associada independentemente ao gênero masculino ( $p=0,02723$ ), à ausência de infiltração de linfócitos FoxP3+ ( $p=0,00089$ ) e a menores níveis de expressão de FoxP3 citoplasmático pela célula folicular ( $p=0,00149$ ). A presença de TLC concomitante foi associada à presença de infiltração de linfócitos CD3+ ( $p=0,00988$ ) e CD20+ ( $p=0,00004$ ). O maior tamanho tumoral foi independentemente associado à ausência de infiltração de linfócitos CD20+ ( $p=0,04384$ ). A análise de Cox, entretanto, não mostrou associação entre as variáveis estudadas e melhor ou pior prognóstico dos pacientes com CDT.



A relação entre TLC concomitante e CDT foi proposta pela primeira vez por Dailey et al. em 1955 (77). Desde essa descrição inicial, a associação entre as doenças tem sido repetidamente relatada e muito debatida na literatura, permanecendo controversa. Na verdade, um pior prognóstico foi relatado em algumas séries (114-115), enquanto a maioria dos estudos mostrou um efeito protetor da auto-imunidade concomitante (92, 96-97, 116), ou um comportamento semelhante entre cânceres com ou sem tireoidite associada (101, 117). Nossos resultados sugerem que a autoimunidade exerça um fator protetor sobre o câncer de tireoide.

Nossos resultados mostraram que a infiltração de macrófagos foi mais freqüente em pacientes mais jovens. Também a infiltração de macrófagos foi associada à presença de metástases ao diagnóstico. Por outro lado, a infiltração de macrófagos foi correlacionada com melhor sobrevida livre de doença. Análise de regressão de Cox não mostrou a infiltração de macrófagos como um marcador de prognóstico independente. Ryder et al. estudaram 37 carcinomas pouco diferenciados da tireoide (PDTC). Eles descobriram que a infiltração de macrófagos aumentou em PDTC, foi associada com invasão capsular, extensão extratireoideana e redução da sobrevida relacionada ao câncer. No entanto, diferente do nosso estudo, o estudo de Ryder não explorou o possível papel de MIT em carcinoma bem diferenciado da tireoide, o que limitou a sua análise (89).

Nós encontramos infiltração de diferentes linfócitos no microambiente tumoral. Todas essas células foram mais freqüentes em lesões malignas. Marcador Pan-T evidenciou que infiltração de linfócitos T foi associada à ausência de cápsula tireoidiana e à presença de metástases ao diagnóstico. Foram avaliados subconjuntos de linfócitos CD4 + (linfócitos T helper) e CD8 + (linfócitos T citolíticos) de acordo com fatores prognósticos. Verificamos que a infiltração de linfócitos T-helper foi correlacionada com a ausência de invasão extratireoideana e



tumores menores. Infiltração de linfócitos T citolíticos foi mais freqüente em mulheres e em pacientes mais jovens. Linfócitos T citolíticos foram mais freqüente em tumores sem cápsula, em tumores menores, nos tumores sem invasão extratireoideana e lesões unifocal. Além disso, o teste de log-rank confirmou que a infiltração de células CD8 + foi associada à sobrevida livre de recidiva maior. Já o linfócito FoxP3+ (T regulatório) foi mais frequente em tumores pequenos, com TLC concomitante e sem invasão extratireoideana.

A composição de LIT foi estudada por Modi e colaboradores que mostraram que 43% de 21 casos de CPT casos possuíam células CD4+ (linfócitos T auxiliares), 38% possuíam células CD8+ (linfócitos T citotóxicos), 48% possuíam células CD19+ (linfócitos B) e somente 1 caso (5%) continha células CD56+ (linfócitos NK)(118). Gupta e col. mostraram que a proliferação de LIT é associada ao aumento do tempo livre de doença em crianças e adultos jovens com câncer de tiróide (92). Porém o baixo número de amostras e curto tempo de seguimento limitam as conclusões destes estudos. Ugolini et al. demonstraram que os tumores com pior prognóstico (pouco diferenciado e carcinoma indiferenciado de tireoide) foram definitivamente caracterizados por redução marcante da infiltração de linfócitos, embora eles não tenham sido capazes de encontrar uma relação direta entre a extensão do infiltrado linfocitário com o prognóstico esperado de diferentes variantes do CPT (119) . Recentemente French et al. encontraram que a presença de LIT em tumores de CPT foi associada à maior agressividade tumoral (120). Ainda, eles encontraram que a infiltração de linfócitos FoxP3+ estava correlacionada à presença de metástases linfonodais (120), sugerindo que a infiltração de tais células conferisse pior prognóstico aos pacientes. Entretanto, vale destacar que neste trabalho foram estudados somente 100 casos de PTC e apenas 10 destes foram avaliados quanto ao tipo de linfócito infiltrante.

Nossos dados mostraram uma frequente infiltração de linfócitos Th17 em CDT. De fato, Su et al. demonstraram elevada infiltração de linfócitos Th17 em diversos cânceres, como melanoma, ovário, mama e cólon (121). Ainda, estes autores demonstraram que células tumorais e fibroblastos residentes no estroma tumoral produzem microambiente tal capaz de mediar o recrutamento de linfócitos Th17 (121). Não só isso, mas estes tumores produzem citocinas pró-inflamatórias e propiciam contato celular que facilita a geração e expansão de linfócitos Th17 (121). Nossos resultados sugerem uma associação entre infiltração de linfócitos Th17 e características de melhor prognóstico, confirmando o fato de que Th17 exerceria papel antitumoral (122).

MDSCs foram encontradas em diversos tipos tumorais humanos, como melanoma (123), mieloma múltiplo (124), hepatocarcinoma (66), próstata (125) e linfoma não-Hodgkin de células T (126). A caracterização de MDSCs é clara em camundongos. Entretanto, o mesmo não ocorre em seres humanos, uma vez que estudos mostram uma variedade fenotípica e funcional que pode depender diretamente do microambiente tumoral (55). Aparentemente, um fenótipo que uniria todos os subtipos de MDSCs seria a coexpressão de CD33 e CD11b (127). A enorme quantidade de marcadores candidatos para caracterização destas células evidencia a complexidade de definição de MDSCs, bem como mostra a dinâmica e plástica natureza destas células, que podem responder a pequenas alterações presentes no microambiente tumoral (55). Provavelmente, este deve ser o motivo pelo qual não encontramos a esperada associação de infiltração de MDSCs e pior prognóstico de CDT.

A expressão de FoxP3 foi inicialmente descrita como restrita ao tecido hematopoiético. Entretanto, achados recentes sugerem que outros tecidos e linhagens celulares também seriam

capazes de expressar FoxP3 (128-131). Nossos dados demonstraram que FoxP3 é expressa não somente em linfócitos infiltrantes de tumores como também em citoplasma e núcleo de células foliculares. O exato papel de FoxP3 na tumorigênese ainda é um ponto de debate. Existem evidências de que FoxP3 atuaria como um gene supressor tumoral em câncer de próstata (132). No entanto, diferentemente do que ocorre em câncer de próstata, nós encontramos expressão de FoxP3 mais freqüente em tumores malignos do que em lesões benignas, sugerindo que esta proteína poderia exercer um papel biológico diferente nos dois tipos de câncer considerados.

Nós encontramos que tumores malignos apresentam maior expressão citoplasmática, mas não nuclear, de FoxP3 do que lesões benignas, sugerindo que a localização citoplasmática de FoxP3 poderia ser resultado da alta taxa de mutações que ocorre durante a transformação celular maligna. De fato, a localização citoplasmática, mas não nuclear, de FoxP3 tem sido considerada como consequência de mutações somáticas. A proteína FoxP3 contém um domínio FKH (do inglês, winged-helix/forkhead) que é um provável sítio que marca a localização nuclear. Mutações neste domínio ou outras modificações transcricionais poderia induzir ao predomínio da localização citoplasmática em células tumorais (133-135).

Nossos dados sugerem que a expressão de FoxP3 nuclear poderia prever um comportamento mais agressivo de CDT. Além de poder promover a evasão tumoral (130), estudos recentes sugerem que FoxP3 poderia modular o padrão de expressão gênica de células tumorais, favorecendo um fenótipo mais agressivo (128). Entretanto, a relação entre a expressão de FoxP3 e o prognóstico de pacientes com câncer permanece não compreendida. Ladoire et al, estudando cânceres de mama que apresentam alta expressão de HER-2, encontraram que a expressão de FoxP3 foi um fator independente para melhor prognóstico, considerando como desfecho tanto recidiva tumoral quanto sobrevida global (133). Diferentemente, Merlo et al

encontraram que a expressão de FoxP3 em tumores de mama foi inversamente associada à sobrevida destes pacientes (128). Os mesmos autores encontraram associação entre expressão de FoxP3 e metástases para linfonodos, confirmando que FoxP3 poderia indicar pior prognóstico. (128).

Várias características de antígenos tumorais e resposta imune aos tumores são fundamentais para a compreensão da imunidade tumoral e desenvolvimento de estratégias para a imunoterapia do câncer. Na verdade, a imunogenicidade de tumores implica que as células tumorais expressam antígenos que são reconhecidos como estranhos pelo sistema imune adaptativo. Tumores expressam moléculas que estão normalmente presentes nas células de origem. Estes antígenos são chamados antígenos de diferenciação, porque eles são específicos para linhagens ou estágios de diferenciação de vários tipos de células (136). A expressão de proteínas como MUC1, NIS e CD56 foi significativamente associada à resposta inflamatória antitumoral. A expressão destas proteínas (enquanto antígenos de diferenciação) poderia explicar parte da reação do sistema imune presente no CDT. MUC1, NIS, e CD56 foram encontradas comuns como marcadores de resposta imunológica antitumoral. Na verdade, essas moléculas são reconhecidas como marcadores tumorais do CDT e suas expressões podem influenciar o diagnóstico CDT (106, 108-109, 137-138) ou prognóstico (104, 139-140).

Nossos resultados indicam que a expressão de PTEN foi correlacionada com presença de linfócitos T citotóxicos e expressão de ATM foi correlacionada à infiltração de macrófagos, células T CD4+, CD8+ e CD20+. Embora a relação entre a PTEN e a resposta imune contra neoplasia ainda não esteja clara, os nossos resultados sugerem que essa proteína poderia melhorar as habilidades de tumor de induzir resposta imune. Esta hipótese é consistente com relatos recentes que indicam que a ativação da via PI3K/Akt representa um novo mecanismo de

escape imunológico e tem implicações importantes para o desenvolvimento de novas estratégias na imunoterapia contra células tumorais (141). Para apoiar ainda mais essa hipótese, tem sido demonstrado que a perda de PTEN está associada com a resistência imunológica (10, 142). Há poucos relatos de ATM como uma molécula moduladora do sistema imunológico. Gomez et al. mostrou que a expressão da proteína ATM foi significativamente diminuída em células de glioma humano imuno-resistentes (143), corroborando nossos achados.

Podemos concluir que o CDT está fortemente correlacionado a uma resposta imunológica antitumoral. Além disso, essa resposta parece melhorar o prognóstico dos pacientes. O microambiente do tumor aparece como uma importante característica biológica crucial para a modulação do ataque imunológico antitumoral, uma vez que o perfil molecular e imunológico dos tumores está associado à antigenicidade tumoral, facilitando o desenvolvimento de uma resposta imune representada pela TLC concomitante, LIT e MIT. Compreender mais sobre os mecanismos envolvidos na defesa antitumoral é importante para delinear e impulsionar a imunoterapia em pacientes com carcinoma da tireóide.



Nossos dados sugerem que o CDT seja ricamente infiltrado por um conjunto de diferentes células do sistema imunológico. Provavelmente esta infiltração é dependente do padrão de expressão gênica e protéica destes cânceres, padrão este que pode refletir a imunogenicidade destes tumores. Mais ainda, a associação entre a infiltração destas células e características de melhor prognóstico, sugere que exista uma resposta imunológica ativa paramentada contra o CDT capaz de exercer papel antitumoral. Especificamente:

1. A expressão gênica de B7-H1 é maior em tumores com apresentavam infiltração de linfócitos CD3+, linfócitos CD4+, linfócitos CD8+ e linfócitos FoxP3+, ainda que não houvesse diferença de expressão de B7-H1 entre os casos com e sem TLC concomitante. Já a expressão protéica de B7-H1 foi maior entre os casos que também apresentavam infiltração de macrófagos, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, linfócitos CD20+ e linfócitos FoxP3+. A expressão desta proteína foi maior entre os casos que apresentavam TLC concomitante ao CDT.
2. Carcinomas diferenciados da tireoide apresentam uma infiltração de diferentes células do sistema imunológico, como linfócitos CD3+, CD4+, CD8+, CD20+ e FoxP3+. Também reportamos uma importante infiltração de linfócitos Th17 e MDSCs em CDT.
3. A presença de infiltração de linfócitos em CDT associou-se a características anatomopatológicas e clínicas de melhor prognóstico, ainda que nenhuma destas variáveis fosse considera fator prognóstico independente.
4. O perfil de expressão gênica e protéica de B7-H1 se correlacionou a características de pior prognóstico, como maior idade de diagnóstico e estadios mais avançados da doença. A quantificação da expressão mostrou que os diferentes tipos de tecidos analisados não

diferiam quanto à expressão de B7-H1. Não houve relação entre a expressão de B7-H1 e características clínicas e anatomopatológicas que remetam à agressividade tumoral.

5. Demonstramos um padrão de expressão protéica (positividade de MUC, NIS, PTEN, CD56 e B7-H1) de CDT associada à presença de linfócitos, macrófagos e MDSCs infiltrantes de tumores.



## ***REFERÊNCIAS***

---

1. Whiteside TL. Tricks tumors use to escape from immune control. *Oral Oncol.* 2009 Oct;45(10):e119-23.
2. Whiteside TL. The role of immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Treat Res.* 2006;130:103-24.
3. Wasiuk A, de Vries VC, Hartmann K, Roers A, Noelle RJ. Mast cells as regulators of adaptive immunity to tumours. *Clin Exp Immunol.* 2009 Feb;155(2):140-6.
4. Bronte V, Mocellin S. Suppressive influences in the immune response to cancer. *J Immunother.* 2009 Jan;32(1):1-11.
5. Subudhi SK, Alegre ML, Fu YX. The balance of immune responses: costimulation verse coinhibition. *J Mol Med (Berl).* 2005 Mar;83(3):193-202.
6. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515-48.
7. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* 2005;6(6):223.
8. Zha Y, Blank C, Gajewski TF. Negative regulation of T-cell function by PD-1. *Crit Rev Immunol.* 2004;24(4):229-37.
9. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 2006 Apr 1;66(7):3381-5.
10. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med.* 2007 Jan;13(1):84-8.
11. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement

of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1027-34.

12. Warren PJ, Earl CJ, Thompson RH. The distribution of copper in human brain. *Brain*. 1960 Dec;83:709-17.

13. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Apr;54(4):307-14.

14. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002 Aug;8(8):793-800.

15. Gregori S, Bacchetta R, Passerini L, Levings MK, Roncarolo MG. Isolation, expansion, and characterization of human natural and adaptive regulatory T cells. *Methods Mol Biol*. 2007;380:83-105.

16. Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev*. 2008 May;7(5):370-5.

17. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1225-32.

18. Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal*. 2007 Mar;3(1-2):171-80.

19. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. A unique subset of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*.

2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4345-54.

20. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmethofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1303-10.
21. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*. 2005 Feb 15;174(4):1783-6.
22. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. 2004 Nov;34(11):2996-3005.
23. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006 Apr;6(4):295-307.
24. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):942-9.
25. Strauss L, Bergmann C, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. The frequency and suppressor function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 1;13(21):6301-11.
26. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, et al. Localisation pattern of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2008 Jan 15;98(1):148-53.
27. Linehan DC, Goedegebuure PS. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T-cells in cancer. *Immunol Res*. 2005;32(1-3):155-68.

28. Whiteside TL. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol.* 2006 Feb;16(1):3-15.
29. Siddiqui SA, Frigola X, Bonne-Annee S, Mercader M, Kuntz SM, Krambeck AE, et al. Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 1;13(7):2075-81.
30. Noshio K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol.* 2010 Dec;222(4):350-66.
31. Salama P, Phillips M, Grieco F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 10;27(2):186-92.
32. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
33. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1123-32.
34. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1133-41.
35. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005 Jan 17;201(2):233-40.

36. Zhang GX, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X, et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol*. 2003 Feb 15;170(4):2153-60.
37. Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol*. 2007 Feb;8(2):172-80.
38. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006 Jun;24(6):677-88.
39. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007 Apr;8(4):345-50.
40. Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM, et al. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res*. 2008 Jun 1;14(11):3254-61.
41. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol*. 2007 Jun 1;178(11):6730-3.
42. Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Minari Y, Takamura M, Iguchi C, et al. Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell-dependent tumor-specific immunity in mice. *Oncology*. 2001;61(1):79-89.
43. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautes-Fridman C, et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):2114-21.

44. Young MR, Newby M, Wepsic HT. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res.* 1987 Jan 1;47(1):100-5.
45. Buessow SC, Paul RD, Lopez DM. Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *J Natl Cancer Inst.* 1984 Jul;73(1):249-55.
46. Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H. Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jul 3;92(14):6254-8.
47. Serafini P, Borrello I, Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol.* 2006 Feb;16(1):53-65.
48. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007 Jan 15;13(2 Pt 2):721s-6s.
49. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol.* 2001 Jan 1;166(1):678-89.
50. Mirza N, Fishman M, Fricke I, Dunn M, Neuger AM, Frost TJ, et al. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res.* 2006 Sep 15;66(18):9299-307.
51. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage,

metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Jan;58(1):49-59.

52. Donkor MK, Lahue E, Hoke TA, Shafer LR, Coskun U, Solheim JC, et al. Mammary tumor heterogeneity in the expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Int Immunopharmacol.* 2009 Jul;9(7-8):937-48.

53. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8<sup>+</sup> T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol.* 2004 Jan 15;172(2):989-99.

54. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol.* 2005 Apr 15;174(8):4880-91.

55. Filipazzi P, Huber V, Rivoltini L. Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Nov 27.

56. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug;5(8):641-54.

57. Bronte V, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Tosello V, Mazzoni A, et al. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 2003 Jan 1;170(1):270-8.

58. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood.* 2007 Feb 15;109(4):1568-73.

59. Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG, Kees UR. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol.* 1998 Jun 15;160(12):5729-34.

60. Harari O, Liao JK. Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and



antioxidants. *Curr Pharm Des.* 2004;10(8):893-8.

61. Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, et al. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev.* 2002 Oct;188:97-113.

62. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 2008 Oct 15;181(8):5791-802.

63. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Jun 15;61(12):4756-60.

64. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor-associated CD8<sup>+</sup> T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol.* 2005 Oct 1;175(7):4583-92.

65. Szuster-Ciesielska A, Hryciuk-Umer E, Stepulak A, Kupisz K, Kandefer-Szerszen M. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol.* 2004;43(3):252-8.

66. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Kruger C, Manns MP, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup>Foxp3<sup>(+)</sup> T cells. *Gastroenterology.* 2008 Jul;135(1):234-43.

67. American Cancer Society. Cancer facts & figures. Atlanta, GA: The Society. p. v.

68. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA.* 2006 May 10;295(18):2164-7.

69. Burgess JR, Tucker P. Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology. *Thyroid.* 2006

Jan;16(1):47-53.

70. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.

71. Instituto Nacional do Câncer (INCA)- Incidência do Câncer no Brasil, estimativa 2012. Disponível em <http://www.incagovbr/estimativa/2012/>. 2010 Aug;consultado em 02/12/2011.

72. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. *J Autoimmun*. 2010 May;34(3):J168-77.

73. Wartofsky L. Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure? *Hormones (Athens)*. 2010 Apr-Jun;9(2):103-8.

74. Ostroumova E, Brenner A, Oliynyk V, McConnell R, Robbins J, Terekhova G, et al. Subclinical hypothyroidism after radioiodine exposure: Ukrainian-American cohort study of thyroid cancer and other thyroid diseases after the Chernobyl accident (1998-2000). *Environ Health Perspect*. 2009 May;117(5):745-50.

75. Gomez Segovia I, Gallowitsch HJ, Kresnik E, Kumnig G, Igerc I, Matschnig S, et al. Descriptive epidemiology of thyroid carcinoma in Carinthia, Austria: 1984-2001. Histopathologic features and tumor classification of 734 cases under elevated general iodination of table salt since 1990: population-based age-stratified analysis on thyroid carcinoma incidence. *Thyroid*. 2004 Apr;14(4):277-86.

76. Laurberg P, Cerqueira C, Ovesen L, Rasmussen LB, Perrild H, Andersen S, et al. Iodine intake as a determinant of thyroid disorders in populations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010 Feb;24(1):13-27.

77. Dailey ME, Lindsay S, Skahen R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland. *AMA Arch Surg*. 1955 Feb;70(2):291-7.

78. Crile G, Jr., Fisher ER. Simultaneous occurrence of thyroiditis and papillary carcinoma; report of two cases. *Cancer*. 1953 Jan;6(1):57-62.
79. Hirabayashi RN, Lindsay S. The Relation of Thyroid Carcinoma and Chronic Thyroiditis. *Surg Gynecol Obstet*. 1965 Aug;121:243-52.
80. Schlicke CP, Hill JE, Schultz GF. Carcinoma in chronic thyroiditis. *Surg Gynecol Obstet*. 1960 Nov;111:552-6.
81. Clark OH, Greenspan FS, Dunphy JE. Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer: indications for operation. *Am J Surg*. 1980 Jul;140(1):65-71.
82. Lindsay S, Dailey ME, Friedlander J, Yee G, Soley MH. Chronic thyroiditis: a clinical and pathologic study of 354 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1952 Dec;12(12):1578-600.
83. Meier DW, Woolner LB, Beahrs OH, Mc CW. Parenchymal findings in thyroidal carcinoma: pathologic study of 256 cases. *J Clin Endocrinol Metab*. 1959 Jan;19(1):162-71.
84. Kebebew E, Treseler PA, Ituarte PH, Clark OH. Coexisting chronic lymphocytic thyroiditis and papillary thyroid cancer revisited. *World J Surg*. 2001 May;25(5):632-7.
85. Bloodworth JMB, Lechago J, Gould VE. Bloodworth's endocrine pathology. 3rd ed. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins; 1996.
86. Singh B, Shaha AR, Trivedi H, Carew JF, Poluri A, Shah JP. Coexistent Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: impact on presentation, management, and outcome. *Surgery*. 1999 Dec;126(6):1070-6; discussion 6-7.
87. Ward LS, Assumpcao LV. The impact of gender in differentiated thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007 May;66(5):752; author reply -3.
88. Dhar DK, Kubota H, Kotoh T, Tabara H, Watanabe R, Tachibana M, et al. Tumor vascularity predicts recurrence in differentiated thyroid carcinoma. *Am J Surg*. 1998

Nov;176(5):442-7.

89. Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Knauf JA, Fagin JA. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2008 Dec;15(4):1069-74.

90. Fiumara A, Belfiore A, Russo G, Salomone E, Santonocito GM, Ippolito O, et al. In situ evidence of neoplastic cell phagocytosis by macrophages in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 May;82(5):1615-20.

91. Matsubayashi S, Kawai K, Matsumoto Y, Mukuta T, Morita T, Hirai K, et al. The correlation between papillary thyroid carcinoma and lymphocytic infiltration in the thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Dec;80(12):3421-4.

92. Gupta S, Patel A, Folstad A, Fenton C, Dinauer CA, Tuttle RM, et al. Infiltration of differentiated thyroid carcinoma by proliferating lymphocytes is associated with improved disease-free survival for children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Mar;86(3):1346-54.

93. McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF. Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. *Mayo Clin Proc*. 1986 Dec;61(12):978-96.

94. Souza SL, Montalli Da Assumpcao LV, Ward LS. Impact of previous thyroid autoimmune diseases on prognosis of patients with well-differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2003 May;13(5):491-5.

95. Holm LE, Blomgren H, Lowhagen T. Cancer risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis. *N Engl J Med*. 1985 Mar 7;312(10):601-4.

96. Kashima K, Yokoyama S, Noguchi S, Murakami N, Yamashita H, Watanabe S, et al.

Chronic thyroiditis as a favorable prognostic factor in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 1998 Mar;8(3):197-202.

97. Loh KC, Greenspan FS, Dong F, Miller TR, Yeo PP. Influence of lymphocytic thyroiditis on the prognostic outcome of patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Feb;84(2):458-63.

98. Schaffler A, Palitzsch KD, Seiffarth C, Hohne HM, Riedhammer FJ, Hofstadter F, et al. Coexistent thyroiditis is associated with lower tumour stage in thyroid carcinoma. *Eur J Clin Invest*. 1998 Oct;28(10):838-44.

99. Ramos AM, Sales Ade O, Barbalho de Mello LE, Cirino de Andrade M, Pinto Paiva F, Ramos CC, et al. Absence of peritumoral fibrosis or inflammatory infiltrate may be related to clinical progression of papillary thyroid microcarcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2009 Dec;17(6):432-7.

100. Del Rio P, Cataldo S, Sommaruga L, Concione L, Arcuri MF, Sianesi M. The association between papillary carcinoma and chronic lymphocytic thyroiditis: does it modify the prognosis of cancer? *Minerva Endocrinol*. 2008 Mar;33(1):1-5.

101. Muzza M, Degl'Innocenti D, Colombo C, Perrino M, Ravasi E, Rossi S, et al. The tight relationship between papillary thyroid cancer, autoimmunity and inflammation: clinical and molecular studies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010 May;72(5):702-8.

102. Cerutti JM, Delcelo R, Amadei MJ, Nakabashi C, Maciel RM, Peterson B, et al. A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. *J Clin Invest*. 2004 Apr;113(8):1234-42.

103. Ward LS, Morari EC, Leite JL, Bufalo NE, Guilhen AC, Araujo PP, et al. Identifying a risk profile for thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Jul;51(5):713-22.

104. Ward LS, Santarosa PL, Granja F, da Assumpcao LV, Savoldi M, Goldman GH. Low expression of sodium iodide symporter identifies aggressive thyroid tumors. *Cancer Lett.* 2003 Oct 8;200(1):85-91.
105. de Matos PS, Ferreira AP, Ward LS. Prevalence of papillary microcarcinoma of the thyroid in Brazilian autopsy and surgical series. *Endocr Pathol.* 2006 Summer;17(2):165-73.
106. Morari EC, Silva JR, Guilhen AC, Cunha LL, Marcello MA, Soares FA, et al. Muc-1 expression may help characterize thyroid nodules but does not predict patients' outcome. *Endocr Pathol.* 2010 Dec;21(4):242-9.
107. Ozolins A, Narbutis Z, Strumfa I, Volanska G, Gardovskis J. Diagnostic utility of immunohistochemical panel in various thyroid pathologies. *Langenbecks Arch Surg.* 2010 Sep;395(7):885-91.
108. El Demellawy D, Nasr AL, Babay S, Alowami S. Diagnostic utility of CD56 immunohistochemistry in papillary carcinoma of the thyroid. *Pathol Res Pract.* 2009;205(5):303-9.
109. El Demellawy D, Nasr A, Alowami S. Application of CD56, P63 and CK19 immunohistochemistry in the diagnosis of papillary carcinoma of the thyroid. *Diagn Pathol.* 2008;3:5.
110. Larson SD, Jackson LN, Riall TS, Uchida T, Thomas RP, Qiu S, et al. Increased incidence of well-differentiated thyroid cancer associated with Hashimoto thyroiditis and the role of the PI3k/Akt pathway. *J Am Coll Surg.* 2007 May;204(5):764-73; discussion 73-5.
111. Di Loreto C, Tell G, Pestrin M, Pandolfi M, Damante G, Puglisi F. PTEN and Egr-1 expression in thyroid proliferative lesions. *Cancer Lett.* 2005 Jun 16;224(1):105-9.
112. Castro MR, Bergert ER, Beito TG, Roche PC, Ziesmer SC, Jhiang SM, et al. Monoclonal

antibodies against the human sodium iodide symporter: utility for immunocytochemistry of thyroid cancer. *J Endocrinol*. 1999 Dec;163(3):495-504.

113. Shaha AR. TNM classification of thyroid carcinoma. *World J Surg*. 2007 May;31(5):879-87.

114. Ozaki O, Ito K, Kobayashi K, Toshima K, Iwasaki H, Yashiro T. Thyroid carcinoma in Graves' disease. *World J Surg*. 1990 May-Jun;14(3):437-40; discussion 40-1.

115. Pellegriti G, Belfiore A, Giuffrida D, Lupo L, Vigneri R. Outcome of differentiated thyroid cancer in Graves' patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Aug;83(8):2805-9.

116. Kim EY, Kim WG, Kim WB, Kim TY, Kim JM, Ryu JS, et al. Coexistence of chronic lymphocytic thyroiditis is associated with lower recurrence rates in patients with papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Oct;71(4):581-6.

117. Yano Y, Shibuya H, Kitagawa W, Nagahama M, Sugino K, Ito K. Recent outcome of Graves' disease patients with papillary thyroid cancer. *Eur J Endocrinol*. 2007 Sep;157(3):325-9.

118. Modi J, Patel A, Terrell R, Tuttle RM, Francis GL. Papillary thyroid carcinomas from young adults and children contain a mixture of lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Sep;88(9):4418-25.

119. Ugolini C, Basolo F, Proietti A, Vitti P, Elisei R, Miccoli P, et al. Lymphocyte and immature dendritic cell infiltrates in differentiated, poorly differentiated, and undifferentiated thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2007 May;17(5):389-93.

120. French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, Said S, Klopper JP, Haugen BR. Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 May;95(5):2325-33.

121. Su X, Ye J, Hsueh EC, Zhang Y, Hoft DF, Peng G. Tumor microenvironments direct the

- recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunol.* 2010 Feb 1;184(3):1630-41.
122. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol.* 2009 Oct 1;183(7):4169-75.
  123. Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R. Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer Res.* 2010 Jun 1;70(11):4335-45.
  124. Brimnes MK, Vangsted AJ, Knudsen LM, Gimsing P, Gang AO, Johnsen HE, et al. Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR/low myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scand J Immunol.* 2010 Dec;72(6):540-7.
  125. Vuk-Pavlovic S, Bulur PA, Lin Y, Qin R, Szumlanski CL, Zhao X, et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/- monocytes in prostate cancer. *Prostate.* 2010 Mar 1;70(4):443-55.
  126. Wilcox RA, Wada DA, Ziesmer SC, Elsayah SF, Comfere NI, Dietz AB, et al. Monocytes promote tumor cell survival in T-cell lymphoproliferative disorders and are impaired in their ability to differentiate into mature dendritic cells. *Blood.* 2009 Oct 1;114(14):2936-44.
  127. Greten TF, Manns MP, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol.* 2011 Jul;11(7):802-7.
  128. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Menard S, et al. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Apr 10;27(11):1746-52.
  129. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, Kerenidi T, et al. Foxp3 expression in human cancer cells. *J Transl Med.* 2008;6:19.
  130. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grussel S, Sipos B, et al. Foxp3



expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res.* 2007 Sep 1;67(17):8344-50.

131. Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer.* 2011 Jun 28.

132. Wang L, Liu R, Li W, Chen C, Katoh H, Chen GY, et al. Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate. *Cancer Cell.* 2009 Oct 6;16(4):336-46.

133. Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Coudert B, Rebe C, Chalmin F, et al. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jan;125(1):65-72.

134. Lopes JE, Torgerson TR, Schubert LA, Anover SD, Ocheltree EL, Ochs HD, et al. Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. *J Immunol.* 2006 Sep 1;177(5):3133-42.

135. Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, et al. FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell.* 2007 Jun 29;129(7):1275-86.

136. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology.* 7th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2012.

137. Abrosimov A, Saenko V, Meirmanov S, Nakashima M, Rogounovitch T, Shkurko O, et al. The cytoplasmic expression of MUC1 in papillary thyroid carcinoma of different histological variants and its correlation with cyclin D1 overexpression. *Endocr Pathol.* 2007 Summer;18(2):68-75.

138. Dohan O, Carrasco N. Advances in Na(+)/I(-) symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol Cell Endocrinol*. 2003 Dec 31;213(1):59-70.
139. Wreesmann VB, Sieczka EM, Socci ND, Hezel M, Belbin TJ, Childs G, et al. Genome-wide profiling of papillary thyroid cancer identifies MUC1 as an independent prognostic marker. *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):3780-9.
140. Ito Y, Miyauchi A. Prognostic factors and therapeutic strategies for differentiated carcinomas of the thyroid. *Endocr J*. 2009 Apr;56(2):177-92.
141. Noh KH, Kang TH, Kim JH, Pai SI, Lin KY, Hung CF, et al. Activation of Akt as a mechanism for tumor immune evasion. *Mol Ther*. 2009 Mar;17(3):439-47.
142. Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Washio K, et al. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *Br J Cancer*. 2006 Jan 30;94(2):247-52.
143. Gomez GG, Hickey MJ, Tritz R, Kruse CA. Immunoresistant human glioma cell clones selected with alloreactive cytotoxic T lymphocytes: downregulation of multiple proapoptotic factors. *Gene Ther Mol Biol*. 2008 Jun;12(1):101-10.



São Paulo, 14 de Junho de 2010.

Ao  
**Dr. Fernando Augusto Soares**

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1259/09-B**  
**“Análise de Biomarcadores de Resposta Imunológica em Carcinoma bem Diferenciado da Tireóide”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 08/06/2010, tomaram conhecimento e aprovaram a seguinte solicitação:

- Solicitação de dispensa da apreciação do estudo intitulado **“Estudo de mecanismos de evasão tumoral ao sistema imunológico empregados pelo carcinoma diferenciado da tireóide”**, em razão de este estudo estar inserido em projeto supracitado, previamente aprovado por este comitê.

Atenciosamente,

  
**Dr. Jefferson Luiz Gross**

**1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

